

# **Bindung und Transport von Tetanustoxin in neuronalen Zellen in vitro**

Von dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Matthias Meder  
geboren am 01. März 1968 in Hannover

Hannover 2000

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper  
Institut für Technische Chemie,  
Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Hans Bigalke  
Institut für Toxikologie,  
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 14. Februar 2001

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe, sowie alle Hilfsmittel angegeben, und die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Inhalte als solche kenntlich gemacht habe.

Hannover, den

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hans Bigalke bedanken, der mir die Anregung zur Bearbeitung des Themas gab, kritischer, aber immer wohlwollender Diskussionspartner war, und mich auf allen Ebenen förderte und unterstützte.

Herr Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die freundliche Betreuung und die Übernahme des Referates.

Ich danke meinen Kollegen des Institutes für Toxikologie für die gute Zusammenarbeit, speziell Carola Kassebaum geb. Ludwig und Tina Hotopp-Herrgesell für die Unterstützung in der Zellkultur sowie Niloofar und Jeannette für die Zeit im gemeinsamen Büro.

Karin und Agi danke ich für die Unterstützung vor, während und nach dem toxikologisch-analytischen Rufbereitschaftsdienst, für Vertrauen und Solidarität - aber auch für die kritischsten Worte und Kommentare in der gesamten Zeit.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Binz, insbesondere Herrn Dipl.-Chem. Andreas Rummel, für die sehr gute Zusammenarbeit in der Zellkultur und bei der Produktion und Testung der rekombinanten Toxine.

Meiner Mitbewohnerin Meike danke ich für die vielen Stunden, die ich an Ihrem PC zubringen durfte und Ihr Zimmer damit blockierte.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Freunden, speziell Anke, Hans und Oliver – die mit Wort und Tat rund um die Arbeit mit den Clostridientoxinen immer wieder ermutigt, und mit viel Geduld auch alle medizinischen Herausforderungen mitgetragen haben.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die trotz des schwer einschätzbaren Fortschreitens der wissenschaftlichen Arbeit doch nie die Hoffnung auf ein Ende dieses Projektes aufgegeben haben.

## Abstrakt

Tetanustoxin (TeNT) wird in infizierten Wunden von dem Bakterium *Clostridium tetanie* produziert und verteilt sich im Organismus. Das Toxin, von dem 100 bis 1000 ng für einen erwachsenen Menschen tödlich sind (Bigalke und Shoer 2000) und welches damit zu den giftigsten Substanzen überhaupt gehört, wird von Nervenzellen aufgenommen und innerhalb der Nervenzellen in das Rückenmark transportiert. Im Rückenmark gelangt es über transzytotische Wege in Interneurone. Dort verhindert es die Freisetzung von Transmittern, die die Aktivität von Motoneuronen unterdrücken. Das klinische Bild des Tetanus oder "Wundstarrkrampf", ist Ausdruck der Ausschaltung der neuronalen Hemmung. Die Erkrankung endet häufig letal, weil eine kontrollierte Atmung nicht mehr möglich ist.

Das Tetanustoxin-Molekül ist ein zweikettiges Protein ( $M_r$  150.000), es besteht aus einer leichten und einer schweren Kette. Die schwere Kette ist für Bindung, zelluläre Aufnahme und intrazellulären Transport verantwortlich, während die leichte Kette als Protease die Exozytose der Transmitter verhindert.

Mittels eines adaptierten 3-Kompartiment-Zellkultursystems wird Bindung und Transport von fluoreszenzmarkiertem Tetanustoxin und einzelner Fragmente sichtbar gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass Transport nur in Rückenmarksneuronen, nicht in Hinterwurzelganglienzellen stattfindet. Weder kurze Fragmente des N-Terminus der schweren Kette, des N-Terminus des Fragments C (34 Aminosäuren) noch des C-Termins des Fragments C (34 bzw. 205 AS, markiert mit GFP bzw. Alexa@488) binden an neuronale Zellen des Rückenmarks. (Dagegen wurde die schwere Kette, markiert mit Alexa@488 bzw. GFP, und das C-terminale Fragment (205 AS) der schweren Kette, markiert mit Alexa@488, gebunden und transportiert.

Der intrazelluläre Transport von TeNT und verschiedenen Fragmenten konnte in dem hier verwendeten System *in vitro* gezeigt werden. Bindung und Transport konnten diskriminiert werden.

Die Konjugation von Green Fluorescence Protein (GFP) verhindert nicht Bindung und Transport von rekombinantem TeNT und verschiedenen Fragmenten. Es konnte dadurch weiterführend gezeigt werden, dass die Nutzung von Teilen des TeNT als „Transportvehikel“ für andere Proteine (gezeigt für GFP, 26 kD) möglich ist. [Schlagworte: Clostridientoxine, Tetanustoxin, axonaler Transport]

## Abstract

Tetanus toxin (TeNT) produced in peripheral lesions, acts on interneurons located in the spinal cord. To arrive at its site of action the 150 kD protein has to pass through several membranes and to surmount the blood brain barrier, using transport routes provided for endogenous products. Following receptor-mediated endocytosis the receptor-toxin complex is sorted into transcytotic vesicles and conveyed from the apical region to the basolateral membrane, i.e., from the axonal terminals to the dendrites. The preference for retrograde axonal transport is assumed to be determined by the Hc-fragment of TeNT because only the holotoxin, the H-chain or the Hc-fragment enter nerve endings, peripheral nerves and cell bodies of alpha-motoneurons. For detailed study of the role the various fragments play in transport, a cell culture model was chosen in which the perikaria of neurones differentiate within one compartment separated from a second compartment in which the processes grow. Thus, any substance applied into one of the two compartments can only gain access to the other compartment if it uses nerve processes for passage. Using native TeNT, recombinant TeNT and different recombinant fragments, all of them labelled with a fluorescence dye, we have recently demonstrated elsewhere that nerve cells of the spinal cord and dorsal root ganglia and the nerve processes located in the compartment into which the fluorescent proteins were applied were labelled. Transport of toxin, however, occurred only in processes of spinal cord cells. In the present report, we show that neither the short fragments of the N-terminal fragment C (34 amino acids (AA), labelled with Alexa488® or GFP) nor the short fragments of the C-terminal H-chain (34 and 205 AA, labelled with GFP) bind to spinal cord neurones. In contrast, the H-chain (labelled with Alexa®-fluorophor or GFP) and the 205 AA C-terminal fragment of the H-chain (labelled with Alexa®488) bind to and are transported in spinal cord cells. It is concluded that axonal transport takes place in vitro and that it is possible to characterize the domains involved in binding, translocation and transport.

[Keywords: Clostridientoxins, Tetanus toxin, axonal transport]

## Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einführung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1	Geräte	15
2.2	Chemikalien	15
2.3	Natives Tetanustoxin	23
2.4	Rekombinante Tetaustoxine	27
2.5	Derivatisierungsreaktionen	38
2.6	Zellkultur	44
2.7	Das 3-Kompartiment-Zellkultursystem	49
<b>3.</b>	<b>Experimente</b>	<b>58</b>
3.1	Bindungsexperimente	58
3.2	Transportexperimente	59
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
4.1	Natives Tetanustoxin und Fragmente	61
4.1.1	TeNT-I <sup>125</sup>	61
4.1.2	TeNT-Alexa®488 (-546, -350 und H <sub>C</sub> -FITC)	64
4.2	Rekombinante Tetanustoxine	71
4.2.1	TeNT <sub>VQ</sub> -His <sub>6</sub> -Alexa®350	71
4.2.2	TeNT-His <sub>6</sub> -Alexa®488	71
4.2.3	TeNT <sub>VQ</sub> -StrepII-Alexa®546	72
4.2.4	TeNT-StrepII-Alexa®488	73
4.2.5	GFP-TeNT-StrepII	75
4.2.6	TeNT-GFP-StrepII	77

4.3	Rekombinante TeNT-Fragmente	78
4.3.1	H <sub>C (865-1315)</sub> TeNT-StrepII-Alexa®488	78
4.3.2	GFP-H <sub>C (865-1315)</sub> TeNT-StrepII	81
4.3.3	H <sub>C (1110-1315)</sub> TeNT-StrepII-Alexa®488	82
4.3.4	GFP-H <sub>C (1110-1315)</sub> TeNT-StrepII	83
4.3.5	H <sub>C (1281-1315)</sub> TeNT-His <sub>6</sub> -Alexa®488	83
4.3.6	GFP-H <sub>C (1281-1315)</sub> TeNT-His <sub>6</sub>	83
4.3.7	His <sub>6</sub> -H <sub>C (865-1112)</sub> TeNT-Alexa®488	83
4.3.8	LH <sub>N (2-1112)</sub> TeNT-StrepII-Alexa®488	83
4.3.9	LH <sub>N (2-876)</sub> TeNT-StrepII-Alexa®488	83
4.3.10	LH <sub>N (865-899)</sub> TeNT-His <sub>6</sub> -Alexa®488	84
4.3.11	LH <sub>N (865-899)</sub> TeNT-GFP-His <sub>6</sub>	84
<b>5.</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	85
5.1	Auswahl und Eignung der gewählten Methodik	87
5.2	Markierungsverfahren	89
5.3	Zellspezifität von Bindung und Transport der Toxine	90
5.4	Eingrenzung der relevanten Domänen	90
5.5	Ausblick	93
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	95
7.	Lebenslauf	



## 1. Einführung und Zielsetzung

Viele Naturstoffe werden in nativer oder modifizierter Form als pharmakologische Wirkstoffe vom Menschen genutzt. Obwohl es noch vor Jahren unvorstellbar war, wird seit einiger Zeit auch die giftigste Substanz, die wir kennen - das Botulinumtoxin - ebenfalls therapeutisch eingesetzt. Die zweitgiftigsten Substanz (Rethy und Rethy 1997), das ebenfalls zur Gruppe der Clostridientoxine gehörende Tetanustoxin, kann nicht „direkt genutzt“ werden, da praktisch alle Menschen in den Industrienationen gegen das Toxin immunisiert sind. Trotzdem könnten einzelne Domänen des Toxins als Teil rekombinant hergestellter Pharmaka z.B. für eine spezifische Aufnahme in neuronale Zellen oder Transport in das Rückenmark sorgen (Schiavo et al. 2000).

Ziel der Arbeit ist eine Charakterisierung der für Rezeptorbindung und intrazellulären Transport verantwortlichen Domänen des Toxinmoleküls in einem Zellkultursystem.

Der Tetanus ("Wundstarrkrampf") und der Botulismus sind langdauernden, schwerwiegende und häufig tödlich verlaufende Erkrankungen, die durch 8 serologisch unterscheidbare Proteine, dem Tetanustoxin und den Botulinumtoxinen A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F und G verursacht werden (Bigalke und Shoer 2000). Die Symptome der Erkrankungen sind Dysfunktionen der quergestreiften Muskulatur - Spasmen beim Tetanus und Paralysen beim Botulismus.

Ausgelöst wird der Tetanus durch die Infektion von Wunden mit *Clostridium tetani*, einem sporenbildendem, stäbchenförmigen Bakterium, das ubiquitär vorkommt. Der Tetanus ist durch eine zunehmende Verkrampfung der Skelettmuskulatur charakterisiert. Die dramatischen klinischen Symptome haben seit Jahrhunderten die Aufmerksamkeit von Ärzten auf sich gezogen. Bereits um 380 v. Chr. beschrieb Hippokrates in seinen Schriften die wundassoziierten Spasmen und ihren häufig innerhalb weniger Tage tödlichen Verlauf. Auch bei den ägyptischen Ärzten der Antike war der Wundstarrkrampf bekannt. Eine sehr anschauliche Beschreibung der klinischen Symptome gab Aretaeus im ersten Jahrhundert nach Christus, der gleichzeitig jede fehlende Behandlungsmöglichkeit beklagt: "Eine unmenschliche Katastrophe! Ein unerträglicher Anblick! Doch der Arzt kann keine Hilfe beisteuern,

weder um das Leben zu retten, noch um Schmerzen oder Entstellungen des Patienten zu beseitigen" (Adams 1856). Sir Charles Bell, ein britischer Neurologe, zeichnete 1824 ein Bild von einem Soldaten im klinischen Vollbild des Tetanus (Abb. 1).

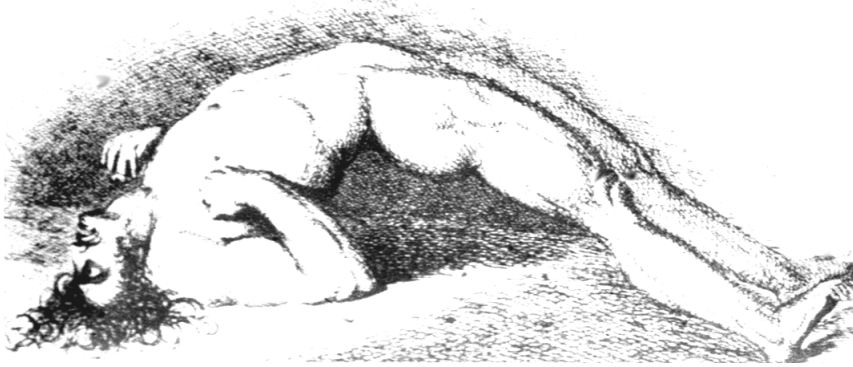


Abb. 1: Zeichnung eines Patienten im "Wundstarrkrampf". Sir Charles Bell, bedeutender Britischer Arzt und Autor des Werkes „Neue Gedanken zur Anatomie des Gehirns“, welches als „Magna Charta der Neurologie“ bekannt wurde, zeichnete dieses Bild eines Soldaten, der im Peninsular-Krieg (1808 – 1814) verwundet wurde, und einen ausgeprägten Tetanus zeigt. Die charakteristischen Symptome wurden vom Zeichner detailliert wiedergegeben: Alle Skelettmuskeln sind maximal kontrahiert. Die Nacken- und Rückenmuskeln sowie die Flexoren überwiegen, und führen zu der charakteristisch gebogenen Körperhaltung mit den gebeugten Armen, Fingern und Zehen. Weitere charakteristische Symptome sind die erstarrte Mimik mit dem „satanischen Grinsen“ durch die Verkrampfung der Gesichtsmuskulatur. (aus: Bell, Essay on the Anatomy and Philosophy of Expression“, London 1824)

Patienten mit derart ausgeprägten Symptomen des Tetanus waren vor der Einführung von Muskelrelaxantien und den Methoden der modernen Intensivmedizin nicht zu retten (Sun et al. 1994). Der Wundstarrkrampf zählte deswegen vor der Einführung der entsprechenden Schutzimpfung zu den Haupttodesursachen nach Verletzungen. Auch in heutiger Zeit erkranken weltweit ungefähr 300.000 Menschen pro Jahr, die Letalität beträgt dabei ca. 50 % (Kayser et al. 1998).

Der Botulismus ist eine nicht weniger schwere Erkrankung als der Tetanus. Die Symptome des Botulismus ähneln denen verschiedener anderer neurologischer Erkrankungen, die eindeutige Diagnose des Botulismus ist deswegen nicht einfach. Beim Botulismus handelt es sich nicht, wie beim Tetanus, um eine Infektion, sondern, von Ausnahmen abgesehen, um eine Intoxikation. Das jeweilige Botulinumtoxin wird mit bakteriell kontaminierter Nahrung aufgenommen, in der es von *Clostridium botulinum* und einigen anderen Spezies unter anaeroben Bedingungen gebildet wird. (Kerner 1820, 1822) Nach dem Genuss der ver-

vorbelebten Lebensmittel kommt es zur Resorption des säurestabilen Toxins im Gastrointestinaltrakt. Innerhalb von Stunden bis Tagen kommt es zu Lähmungserscheinungen, zunächst vor allem im Bereich der Kopfnerven: Die Folgen sind Diplopie, Schluckstörungen, Sprechschwierigkeiten und trockene Schleimhäute. Später kommen Paralysen der Arbeitsmuskulatur und Obstipation hinzu. Die Letalität liegt zwischen 25 und 70 %. Der Tod tritt meist durch eine Lähmung der Atemmuskulatur ein (Kayser et al. 1998).

Der seltene Wundbotulismus resultiert aus der Infektion der Wunde mit *C. botulinum* (Burningham et al. 1994). Der Säuglingsbotulismus wird durch die Aufnahme von Sporen von *C. botulinum* mit der Nahrung des Säuglings verursacht, die Anfälligkeit von Säuglingen im Alter bis zu 6 Monaten resultiert aus der noch nicht voll ausgebildeten physiologischen Darmflora (Arnon 1980; Kayser et al. 1998).

Der pathophysiologische Mechanismus der Wirkung von Tetanustoxin und den Botulinumtoxinen beruht immer auf der Inhibition der Ausschüttung von Neurotransmittern aus Neuronen. Die Toxine wirken dabei als Metalloproteasen, die selektiv die Proteine zerschneiden, die die Fusion der Neurotransmittervesikel mit der neuronalen Membran bei der Exozytose ermöglichen (Montecucco und Schiavo 1995).

Die Clostridientoxine sind ca. 150 kD Proteine (Fairweather und Lyness 1986; Binz et al. 1990), die zu den sogenannten AB-Toxinen gehören. Sie bestehen aus zwei unterschiedlichen Teilen mit unterschiedlichen Funktionen. Ein Molekülteil ist der pharmakokinetisch wirksame, der den anderen Teil, den pharmakodynamischen Teil, durch die Zellmembran in das Zellkompartiment navigiert, in dem das Substrat vorliegt. Der pharmakokinetische Teil besteht aus der schweren Kette (Heavy Chain, HC, ca. 100 kD), während der enzymatische Anteil in der leichten Kette (Light Chain, LC, ca. 50 kD) lokalisiert ist. Die Bakterien produzieren die Toxine als inaktive, einkettige Proteine (Single Chain, SC), die zur Aktivierung an einer bestimmten "nicking site" durch begrenzte Proteolyse geschnitten werden müssen. Physiologisch werden die Proteine durch eine parallel exprimierte clostridielle Protease genickt, die jedoch auch durch Trypsin oder verschiedene

andere Proteasen ersetzt werden kann (Weller et al. 1988; Habermann et al. 1991). Die beiden entstehenden Proteinketten sind durch eine Disulfidbrücke und ionische Wechselwirkungen verbunden. (Abb. 2)

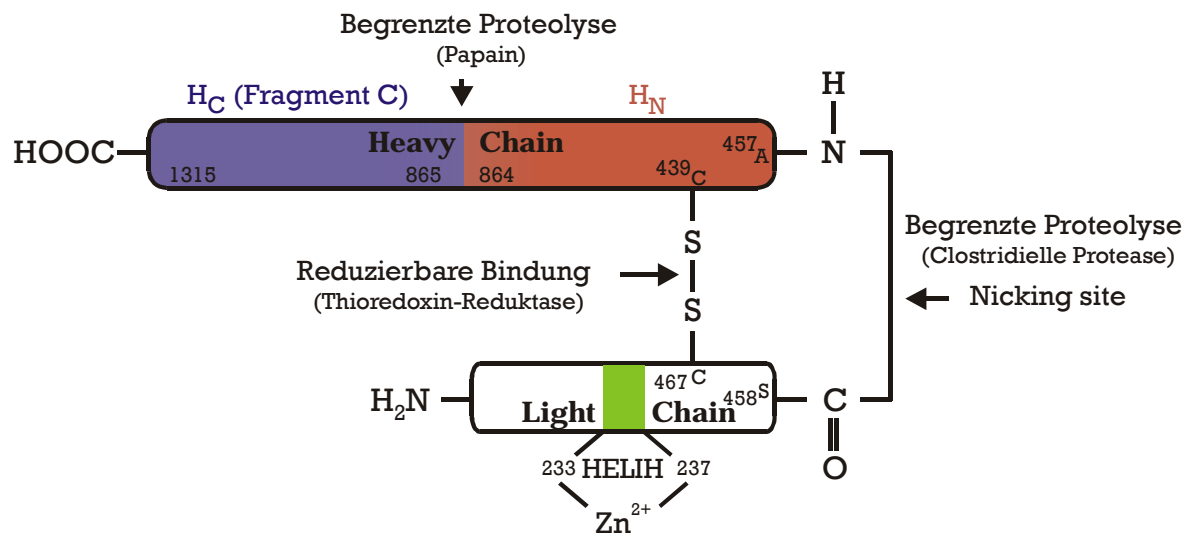


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Tetanusneurotoxins (TeNT)

Dieses „Dichain“-Toxin stellt das eigentliche Neurotoxin dar. Das Neurotoxin kann unter reduzierenden Bedingungen in seine beiden Ketten getrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses beim TeNT durch isoelektrische Fokussierung in einem pH-Gradienten in einer Vesterberg-Säule (Vesterberg und Svenson 1966) nach einer Vorschrift von Weller (Weller et al. 1989) erreicht. Die isoelektrischen Punkte der beiden Ketten des TeNT liegen bei 4,8 (LC TeNT) und 7,2 (HC TeNT) (Sathyamoorthy und DasGupta 1985; Weller et al. 1989). Die einzelnen Ketten sind nach ihrer Trennung nicht mehr toxisch, da die schwere Kette keine proteolytische Aktivität aufweist, und die leichte Kette keine Zellmembranen durchdringen kann. Eine Rekonstitution der Einzelketten zum aktiven Neurotoxin erfolgt unter nichtreduzierenden Bedingungen in neutralen pH-Bereich. Es können auch Heterodimere aus HC und LC unterschiedlicher Serotypen hergestellt werden. (Weller et al. 1989, 1991)

Durch Papainspaltung der „Dichain“-Toxine können neben den beiden Ketten (LC und HC) weitere Fragmente (vgl. Abb. 2) erzeugt werden. H<sub>C</sub> (C-Terminus der schweren Kette entspricht dem Fragment C in älterer Literatur) und H<sub>N</sub> (N-Terminus der schweren Kette), sowie L<sub>H</sub> (leichte Kette mit H<sub>N</sub>). Eine Übersicht der

verwendeten und inzwischen weitgehend vereinheitlichten Nomenklatur findet sich bei Niemann (Niemann 1991).

Nach der Aufnahme der Toxine in den Blutkreislauf werden fünf Schritte bis zur eigentlichen proteolytischen – und damit toxischen – Wirkung durchlaufen: Bindung an neuronale Zellen, rezeptorvermittelte Endozytose, Translokation aus dem Endosom ins Zytosol, reduktive Aktivierung und Proteolyse. Die ersten vier Schritte repräsentieren Leistungen der Zelle und erst der letzte Schritt wird vom Toxin ausgeführt und führt zur Hemmung der Neurotransmitterausschüttung.

Die Clostridientoxine treten in das Nervensystem an den präsynaptischen Regionen der neuromuskulären Verbindungen (Wernig et al. 1977; Dolly et al. 1984; Black und Dolly 1986 a, b; Bergey et al 1987) und an den Enden der autonomen Nerven (Ambache und Lippold 1949; Hensel et al. 1973) ein. TeNT bindet nicht nur an peripheren Nerven, sondern auch unspezifisch an Schilddrüsen- und Nierengewebe sowie an Inselzellen der Bauchspeicheldrüse (Lesley et al. 1977; Habermann und Albus 1986; Eisenbarth et al. 1981; Gaisano et al. 1994). Diese Bindungen haben keine Signifikanz für die Pathogenität des Toxins.

Im Gegensatz zu den anderen Gewebearten ist neuronales Gewebe reich an Gangliosiden, die mehr als einen Neuraminsäure-Rest enthalten (Wiegandt 1985). TeNT und BoNT/A, B, C<sub>1</sub>, und F binden vorrangig an Ganglioside mit mehr als einem Neuraminsäure-Rest (van Heyningen und Miller 1961; Simpson und Rapport 1971; van Heyningen und Mellanby 1973; Ochanda et al. 1986; Kozaki et al. 1998). Die gangliosid-bindende Domäne ist im Bereich der C-terminalen 34 Aminosäuren (AS) der HC (gezeigt für TeNT, Shapiro et al. 1997) lokalisiert. Die Ganglioside lassen sich nach der Anzahl der Neuraminsäure-Reste unterscheiden (Marxen und Bigalke 1989; Marxen et al. 1991). TeNT und BoNT/A binden an unterschiedliche Gangliosid-Typen. (Emsley et al. 2000). Da die inhibitorische Wirkung des TeNT im wesentlichen durch GD<sub>1b</sub> vermittelt wird, das BoNT jedoch über GD<sub>1a</sub> und GT<sub>1b</sub> wirkt (Marxen und Bigalke 1989; Marxen et al. 1991), konkurrieren die Toxine nicht um die Ganglioside (Dolly et al. 1984; Williams et al. 1983; Wadsworth et al. 1990). Gar nicht binden sie an das ubiquitär vorkommende Gangliosid GM<sub>1</sub>, welches den Rezeptor für das Choleratoxin darstellt (Critchley et al. 1988; Niemann 1991).

Es wurden bereits die Bindungen der Clostridientoxine nach direkter Exposition an isolierte Nervenzellen, Gehirnpräparationen und neuronale Zelllinien gezeigt (Habermann und Heller 1975; Kitamura 1976; Williams et al 1983; Critchley et al. 1988; Dimpfel et al. 1977; Bigalke et al. 1981; Wellhöner und Neville 1987). Ferner konnte eine Bindung an festen Oberflächen (Holmgren et al. 1980), Lipidvesikeln (Montecucco et al. 1989), künstlichen Membranen (Yavin et al. 1987) und chromaffinen Zellen (Marxen und Bigalke 1989; Marxen et al. 1989) gezeigt werden, wenn diese Strukturen künstlich mit Gangliosiden versehen wurden.

Die Affinität der Bindung an Ganglioside ist im Vergleich zu der Bindung an neuronalen Zellen um ein Vielfaches geringer (Montecucco und Schiavo 1995), so dass vermutet wird, dass ein von Nervenzellen exprimiertes Protein einen weiteren Rezeptor für Clostridientoxine darstellt (Pierce et al. 1986; Parton et al. 1988; Schiavo et al. 1991). So bindet BoNT/B an den N-Terminus des Vesikelproteins Synaptotagmin (Nishiki et al. 1994; Nishiki et al. 1996), welcher in das Vesikellumen hineinragt – und erst nach der Exozytose auf der Außenseite der Nervenzelle zugänglich ist. Daher findet eine Initialisierung des Toxins nur statt, wenn die Nervenzellen stimuliert werden (Simpson 1980; Schmitt et al. 1981) und Endozytose abläuft (Matteoli et al. 1996).

Da die Bindung der Clostridientoxine an die gesamte Außenmembran der Nervenzelle erfolgt (Dimpfel et al. 1975; Dimpfel et al. 1977; Bigalke et al. 1986), könnte dem Synaptotagmin die Rolle Proteinrezeptors zukommen.

Die Bindung der Toxine kann durch Neuroamidasen, die die Neuraminsäure-Reste von den Gangliosiden entfernen, nahezu aufgehoben werden (Halpern und Neale 1995; Bigalke et al. 1986). Bereits an neuronale Endköpfchen gebundenes Toxin kann durch Zugabe von Anti-Toxin-Antikörpern neutralisiert und die Paralyse des Muskels dadurch verhindert werden (Schmitt et al. 1981; Simpson 1989; Dreyer 1989).

TeNT und BoNT/A konnten in kleinen vesikulären Strukturen (Morants et al. 1996; Parton et al. 1987), in zytoplasmatischen clathrin-coated (Black und Dolly 1986a, b) und non-coated Vesikeln sowie Lysosomen nachgewiesen werden (Schwab und Thoenen 1976; Montesano et al. 1982).

Die experimentellen Befunde lassen vermuten, dass es sich bei der Bindungsstelle für Clostridientoxine um einen Doppelrezeptor handelt, dessen einer Teil ein Gangliosid ist, während der andere Teil aus einem exklusiv von neuronalem Gewebe exprimierten Protein besteht.

Die in Endosomen eingeschlossenen Toxine können die Exozytose nicht stören, da sich ihr Substrat im Zytosol befindet. Die Translokation aus dem Vesikel in das Zytosol findet vermutlich statt, wenn der Inhalt der Vesikel angesäuert wird. Bafilomycin, welches die Protonen-transportierende ATPase hemmt und dadurch die Ansäuerung der Vesikel unterbindet, verhinderte die Blockade der Exozytose (Matteoli et al. 1996; Simpson et al. 1994; Williams und Neale 1994). Wahrscheinlich, bedingt durch eine Konformationsänderung des Toxins bei niedrigem pH-Wert dringen die Toxinmoleküle in die Membran ein (Boquet et al. 1984; Roa und Boquet 1985; Menestrina et al. 1989; Schiavo et al. 1991).

Ist der pH-Wert auf der anderen Seite der Membran höher, löst sich das Toxin aus der Membran und diffundiert ins Zytosol (Bigalke et al. 1995, 1996). Es konnte an endosomal-vergleichbaren Membranen gezeigt werden, dass es während der Penetration der Toxinmoleküle zur Leitfähigkeitsänderung kommt, wie sie auch bei der Kanalbildung beobachtet wird. (Hoch et al. 1985; Shone et al. 1987; Gambale und Montal 1988; Rauch et al. 1990; Schmid et al 1993; Sheridan 1998; Beise et al. 1994). Die geringen Leitfähigkeiten lassen jedoch auf recht kleine Poren schließen, zu klein, um den Durchtritt des Toxins zu ermöglichen. Es scheint, dass die Leitfähigkeitsänderung lediglich ein Ausdruck der Toxin-Membran-Interaktion darstellt.

Der Vergleich der Clostridientoxinen mit anderen porenformenden Toxinen ergab keine strukturellen Übereinstimmungen. Ähnlichkeiten wurden lediglich mit viralen Proteinen gefunden, die zwar keine Poren formen, aber auch Membranen durchdringen können, und deren Struktur ebenfalls pH-abhängig ist (Lacy et al. 1998).

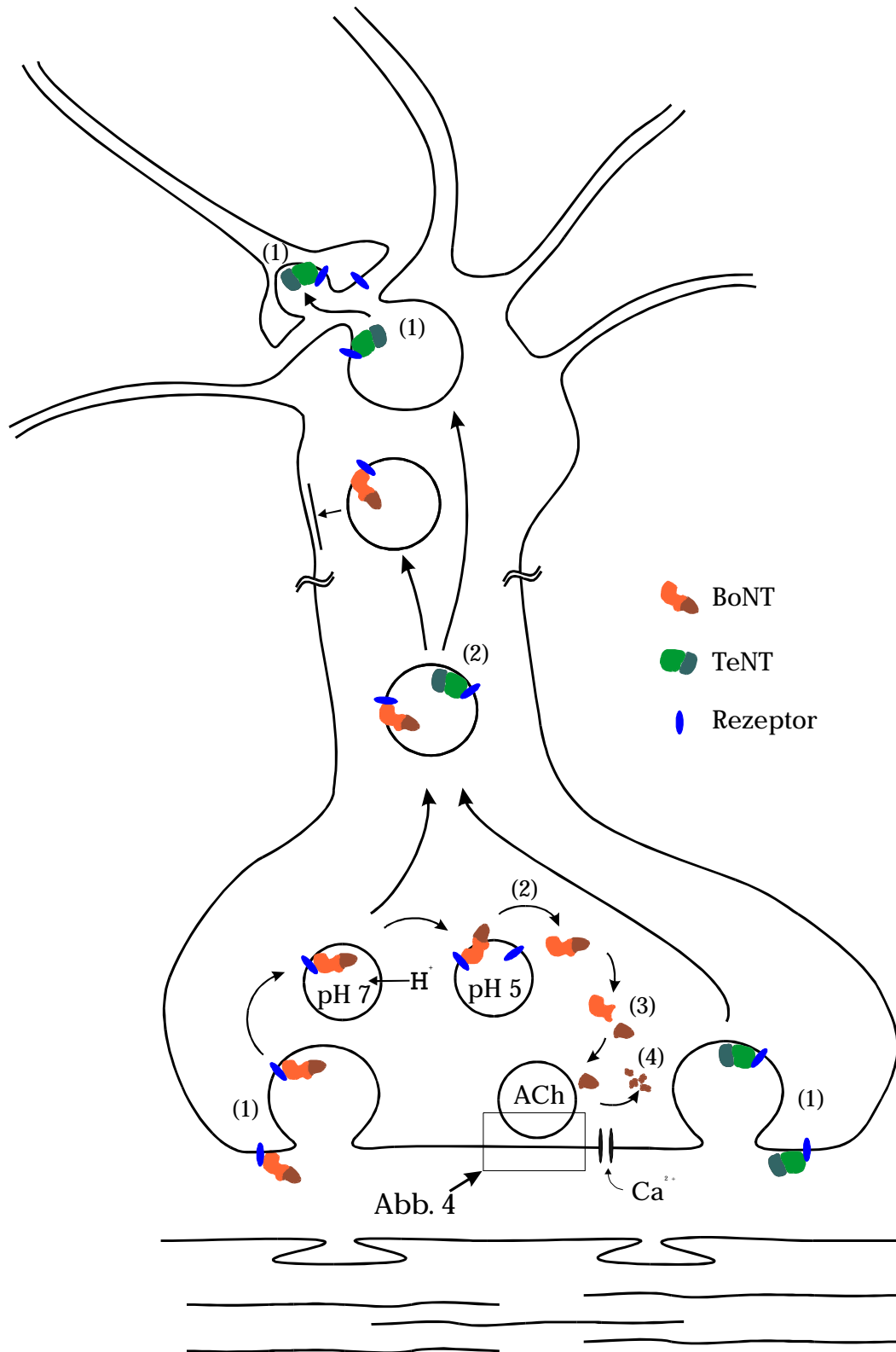


Abb. 3: Schema der Kinetik und des Metabolismus von TeNT und BoNT (Erläuterung im Text)



Eingangs wurde bei der Darstellung der klinischen Symptome auf einen ähnlichen, aber offensichtlich nicht gleichen Wirkmechanismus der Clostridientoxine hingewiesen: Während die Botulinumtoxine an der motorische Endplatte wirken, stört das TeNT die Exozytose in hemmenden Neuronen im Rückenmark. Beim TeNT kommen also noch zusätzliche Transportschritte hinzu. Zumindest ein Teil des zunächst in das periphere Neuron aufgenommenen Toxins verlässt das Neuron im Rückenmark. Dort wird es von (hemmenden) Interneuronen aufgenommen, in denen ein ähnlicher, wenn nicht gleicher Aktivierungsprozess wie in den peripheren Nerven abläuft. In Abb. 3 sind Wanderung und Metabolismus der Toxine zusammenfassend dargestellt. Die „Dichain“-Toxine (BoNT und TeNT) werden durch rezeptorvermittelte Endozytose (1) von den Neuronen aufgenommen und via Axon in das Rückenmark transportiert. Das TeNT wird dort vom Zellsoma freigesetzt und anschließend von Interneuronen aufgenommen. Nach der Ansäuerung der Vesikel durch eine ATPase gelangt das BoNT in das Zytosol der Enden der motorischen Neuronen (2), während das TeNT die präsynaptischen Enden der Interneuronen erreicht. Im Zytosol wird sowohl das BoNT, als auch das TeNT, durch die Thioredoxin-Reduktase gespalten (3) und die jeweilige LC der Toxine zerschneiden ihre entsprechenden Substrate. Die leichten Ketten werden vermutlich nach einiger Zeit selbst zu inaktiven Fragmenten metabolisiert (4), wodurch eine Regeneration der Exozytose in den präsynaptischen Nervenenden eingeleitet wird.

Die Clostridientoxine bleiben in den Zellen über einen längeren Zeitraum aktiv. (Bartels und Bigalke 1992) In neuronaler Zellkultur wurde eine Halbwertszeit von 3 bis 5 Tagen gemessen (Habig et al. 1986). Die gleiche Halbwertszeit wurde für LC von TeNT und LC von BoNT/A in chromaffinen Zellen gefunden (Erdal et al. 1995).

Die Clostridientoxine nutzen vermutlich physiologische Transportmechanismen, die innerhalb der Neuronen für den Transport von z.B. metabolischen Endprodukten sorgen. Epitheliale Zellen nutzen einen ähnlichen Transportmechanismus für Immunglobulinrezeptoren (Mostov 1993). Nach der rezeptorvermittelten Endozytose wird der Immunglobulin-Rezeptor-Komplex in transzytototische Vesikel verpackt und zielgerichtet zu der apikalen Membran

transportiert, von der die Immunglobuline freigesetzt werden. In diesem Fall trägt der Immunglobulinrezeptor die Kodierung für die Routenauswahl (Mostov 1993).

Für die Wahl des spezifischen „intrazellulären Weges“ (Routing) der Clostridientoxine ist das H<sub>C</sub>-Fragment der Neurotoxine zuständig, denn nur das Gesamttoxin (DC), die schwere Kette (HC) oder das H<sub>C</sub>-Fragment (H<sub>C</sub>), nicht aber LC oder LH<sub>N</sub> binden an Nervenzellen oder werden transportiert.

Während BoNT die Vesikel an den motorischen Endköpfen verlassen muss, um SNAP25 zu spalten, wird das TeNT in das Rückenmark transportiert. Die Information für dieses unterschiedliche Routing könnte – wie bei den Immunglobulinen – im Toxin-Rezeptor enthalten sein: Wie oben beschrieben, gibt es z.B. Unterschiede in der Affinität zu den verschiedenen Gangliosiden. Ob es unterschiedliche Proteinanteile im Rezeptor für BoNT und TeNT gibt, wurde bisher nicht gezeigt. Wie die Immunglobuline die Epithalzellen, verlässt auch TeNT die Motoneurone (Schwab und Thoenen 1977; Schwab et al. 1979) und wird in der Folge von Interneuronen aufgenommen, in denen es die Exozytose hemmt (Osborne und Bradford 1973). Wird BoNT direkt in das Rückenmark injiziert, wirkt es jedoch auch dort auf Interneurone (Hagenah et al. 1977).

Die Ausschleusung des intrazellulär transportierten TeNT im Rückenmark erfolgt vermutlich ebenfalls über einen Exozytose-Mechanismus – dieser wird offenbar jedoch nicht durch das TeNT gehemmt, denn sonst würde das TeNT den interneuronalen Raum und damit das folgende inhibitorische Interneuron nicht erreichen (Erdmann et al. 1981). Möglicherweise lässt sich das Ausbleiben der Exozytose von BoNT (u.U. ist ein Transport möglich, nur die Exozytose nicht) durch die größere Empfindlichkeit des Exozytose-Apparates gegenüber BoNT erklären. Die Botulinumtoxine selbst könnten so eine tetanusartige Wirkung im Rückenmark verhindern.

Für die Proteolyse der SNARE-Proteine sind nur die leichten Ketten der Clostridientoxine verantwortlich (Stecher et al. 1989a, b; Ahnert-Hilger et al. 1989; Bittner et al. 1989; Dayanithi et al. 1990, 1992; dePavia und Dolly 1990; Schiavo et al. 1992a, b, c, 1993a, b; Link et al. 1992; Blasi et al. 1993a, b; Hayashi et al. 1994). Es ist

noch nicht vollständig geklärt, ob und wie das Toxinmolekül das Vesikel verlässt, bzw. ob lediglich die leichte Kette das Zytosol erreicht. In jedem Fall muss die Disulfidbindung zwischen leichter und schwerer Kette reduzierend gespalten werden, um die enzymatische Aktivität der LC zu ermöglichen. Wahrscheinlich ist das neuronale Thioredoxin-Reduktase-System an dieser Kettentrennung beteiligt. In vitro konnte das Redox-System aus Hirnzellen (Kistner und Habermann 1992) und chromaffinen Zellen (Erdal et al. 1995) die Disulfidbrücke spalten. Dieses endogene Enzymsystem schützt die neuronalen Zellen physiologischerweise vor freien Radikalen. Es liegt nahe, dass dieses Enzym auch das „Dichain“-Toxin, (im Sinne einer „Prodrug“) in die aktive Komponente (die leichte Kette) umwandeln können.

Der proteolytische Wirkmechanismus der leichten Kette ist aufgeklärt. Es handelt sich bei dem aktiven Zentrum des Tetanustoxins und der Botulinumtoxine um ein  $\text{Zn}^{2+}$ -haltiges HELiH-Motiv (vgl. Abb. 2), welches sich auch bei anderen Metalloproteasen findet.

Das Substrat der Clostridientoxine ist sowohl an der Membran-Außenseite der Vesikel, als auch an der präsynaptischen Membran-Innenseite lokalisiert. Es handelt sich um eine Gruppe von Proteinen, die als „lösliche NSF-gebundene Proteinrezeptoren“ (soluble **N**-ethylmaleimide-sensitive fusion protein-**attach**ment protein **re**ceptors, SNAREs) bezeichnet werden.

Nach dem derzeitigen Wissenstand ist ein v(vesicle)SNARE, das Synaptobrevin, auf der Außenseite der synaptischen Vesikel lokalisiert. Zwei weitere t(target)SNAREs, das Syntaxin und das SNAP-25 (**s**ynaptosomal-**a**ssociated **p**rotein mit dem relativen Molekulargewicht 25 kD) befinden sich auf der Innenseite der präsynaptischen Membran. Diese drei SNARE - Proteine sind im Wesentlichen an der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran beteiligt (Söllner et al. 1993; Südhof et al. 1993; Scheller 1995; Südhof 1995; Calakos und Scheller 1996; Hanson et al. 1997; Sutton et al. 1998). Die verschiedenen Toxine schneiden die genannten SNAREs an unterschiedlichen Stellen (Abb. 4 C).

LC von TeNT und LC von BoNT/B schneiden Synaptobrevin an der gleichen Stelle (Glu 76). LC der BoNT-Serotypen D, F und G schneiden ebenfalls Synaptobrevin, jedoch jeweils an anderen Stellen (Lys 59, Glu 58 bzw. Ala 81). Die leichten Ketten von BoNT/A und E spalten SNAP-25 bei Glu 25 bzw. Arg 81 (Übersichtsarbeit: Montecucco und Schiavo 1995). LC von BoNT/C1 hat als einziges Enzym zwei Substrate, Syntaxin (Lys 253) und SNAP-25 (Arg 198) (Vaidyanathan 1999).

Der genaue Mechanismus der Integration des synaptischen Vesikels in die Plasmamembran ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach den experimentellen Befunden und dem heutigen Wissenstand sind zwei unterschiedliche Modelle für den Ablauf der Exozytose und die Rolle der v- und tSNAREs vorstellbar.

Das Vesikel könnte über das vSNARE durch Komplexbildung mit dem tSNARE an die Plasmamembran ankoppeln. Der ebenfalls beteiligte N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) wird gespalten und aktiviert dabei den SNARE-Komplex. Die Aktivierung bewirkt dann die Fusion des Vesikels mit der Membran (Abb. 4 A).

Es wäre auch möglich, dass ein nichtfunktioneller SNARE-Komplex bereits auf der Vesikelmembran (Hanson und Jahn 1997) vorliegt (Abb. 4 B), dieser aber zunächst zerfällt, und sich dann ein funktioneller Komplex – diesmal mit dem tSNARE der Plasmamembran - bildet (Hanson et al. 1997; Sutton et al. 1998).

Der Membranfusion folgt immer ein Recycling der Vesikelmembran durch Endozytose innerhalb weniger Sekunden (Rothman und Wieland 1996; Wendland et al 1998; Warren und Malhotra 1998; Kaiser und Ferro-Novick 1998).

Der konkrete Zeitpunkt der Transmitterausschüttung, d.h. der Integration des Vesikels in die Plasmamembran, wird durch die Calciumionenkonzentration reguliert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanäle zur Verfügung gestellt (Chapman et al. 1995; Banerjee et al. 1996; Martin 1997). Deren Aktivierung folgt der Erregung der Nervenzelle. Die Calciumionen transformieren ein weiteres an der Fusion beteiligtes Protein, das Synaptotagmin. Dieses wirkt als Calciumionen-Sensor (Chapman et al. 1995). Bei Depolarisation und intrazellulärem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration bindet Synaptotagmin Calciumionen und ändert seine Konformation.

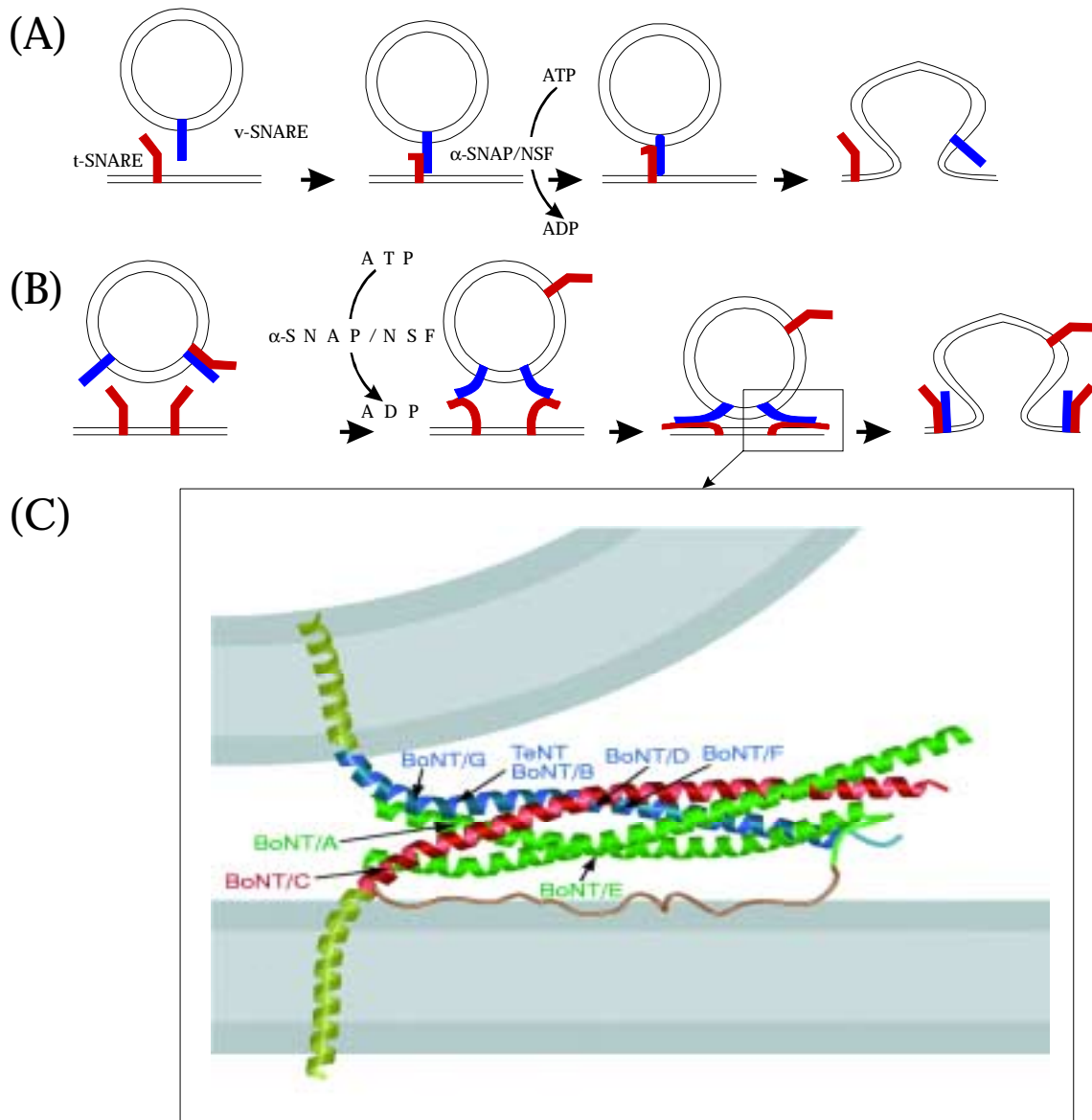


Abb. 4: SNARE-Proteine als Substrate von BoNT (Serotypen A, B, C, D, E, F und G) und von TeNT. SNAP-25 ist hellgrün, v- bzw. tSNARE sind blau bzw. rot, die jeweiligen Membran-Domäne ist moosgrün dargestellt. (verändert nach Hanson et al. 1997)

Die Umsetzung des innerhalb der Nervenzelle „elektrisch“ fortgeleiteten Nervenimpulses in ein chemisches Signal - und damit die Weiterleitung zur nachgeschalteten Nervenzelle - erfolgt durch das Zusammenwirken des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Synaptotagmins mit den o.g. SNAP- und SNARE-Proteinen des Exozytose-Apparates. Exozytosevorgänge in allen Zellen basieren auf ähnlichen Reaktionsabläufen dieser Proteinstrukturen.

Die Clostridientoxine rückten aufgrund ihrer sehr spezifischen Eigenschaften in den letzten Jahren verstärkt in das Interesse der Forschung, trotzdem sind noch

verschiedene Fragen zum Mechanismus und zur Wirkung der Clostridientoxine unbeantwortet.

In dieser Arbeit sollen folgende Aufgaben gelöst werden:

1. Entwicklung eines *in vitro* – Zellkultursystem zur Untersuchung des axonalen Transportes von TeNT.
2. Eingrenzung der für die Bindung und Transport von TeNT verantwortlichen Domänen.
3. Welche Manipulationen am Molekül beeinträchtigen Bindung, Zellaufnahme und Transport von TeNT?

Nach der Etablierung und Modifikation eines von R. B. Campenot (Campenot 1982a, b) und P. Sonderegger (Sonderegger et al. 1983) zur Untersuchung von neuronalen Wachstumsfaktoren entwickeltes Mehr-Kompartiment-Zellkultursystems soll auf der Grundlage der dargestellten Befunde und Fragen Bindung und Transport von nativen TeNT sowie rekombinanten Mutanten und Fragmente untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit die im Folgenden aufgeführten Geräte und Chemikalien verwendet.

### 2.1 Geräte

4er Wells, je 15 x 10 mm, Nunclon®	Nunc
Biokular	Nikon Tension
CO <sub>2</sub> - Inkubator	Haereus
Diafilme 5077 ET 160 Kunstlicht, 35 mm	Kodak
Digitales Kamera System SPOT zu TE 300	Visitron Systems
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE 300	Nikon
Fluoreszenzmikroskop IMT2 - RFL	Olympus
Fotoapparat zu IMT2 - RFL	Olympus
Gelelektrophorese Mini Protean® 200/2.0	BioRad
High Resolution Color Scanner JX-325	Sharp
ImageMaster™ 1-D	Pharmacia Biotech
Kulturschalen, 35 x 10 mm Primaria®	Becton Dickinson
Pinzetten No. 5, gewinkelt 45°	Plano
Schlauchpumpe L120	LKB
Teflon-Inserts (verschiedene Bauformen, Eigenbau)	Forschungswerkstatt MHH
Ultrazentrifuge L8-70 M	Beckman
Ultrazentrifuge RC2-B	Sorvall
Vakuummikrozentrifuge DNA mini	Heta-Holten

### 2.2 Chemikalien

2,5-Diphenyloxazol (PPO)	New England Nuclear
2-[4'-Hydroxy-benzenazo]-benzoesäure (HABA)	Sigma
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Riedel De Haën
2-Propanol, p.A.	Merck
4-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth
8-Hydroxychinolin	Merck

Acrylamid, für Gelelektrophorese	Sigma
AlexaFluor®350, -488, -546	Molecular Probes
Aminosäuremix ohne Methionin	Promega
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma
Anhydrotetracyclin	Acros Chemicals
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Hefeextrakt	Difco
Bayer-Silicone	Bayer AG
Benzamidin	Sigma
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma
Bromphenolblau, Natriumsalz, reinst	Serva
Capping Reagent, 7mG(5')ppp(5')G, Natriumsalz	Biolabs
Coomassie Brilliant Blue R 250	Merck
Corticosteron	Sigma
DATP	Boehringer Mannheim
DCTP	Boehringer Mannheim
DE 52	Aldrich
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	Fluka
Dephosphorylierungspuffer (10 x)	Boehringer Mannheim
DGTP	Boehringer Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Serva
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei, p.A.	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dithiothreitol (DTT) für <i>in vitro</i> Transkription	ACS
DNase I (E.C. 3.1.21.1)	Boehringer Mannheim
DTTP	Boehringer Mannheim
Ethanol, p.A.	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Dinatriumsalz, p.A.	Serva
Fetale Calve Serum (FCS)	GibcoBRL
Fibrinkleber Tissucol®	Immuno
(+)-5-Fluor-2-Desoxyuridin (FUDR), p.A.	Sigma
Gel Drying Film 25,5 x 28,0 cm	Promega



Glycerin, p.A.	Serva
Ham's F 12 (Nutrient Mixture)	Gibco
Harnstoff, p.A.	Carl Roth
Hefeextrakt, für die Bakteriologie	Carl Roth
High Vacuum Grease	Dow Corning
Imidazol	Merck
Insulin, für Zellkultur	Sigma
Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (IPTG), dioxanfrei	Merck
Kaliumchlorid, p.A.	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat, p.A.	Merck
Kanamycin, 781 $\mu$ g/mg Pulver	USB
Collagen R	Serva
Ligationspuffer (10 x)	Biolabs
Methanol, p.A.	J. T. Baker
Methylcellulose (Methocel)	Sigma
Minimal Essential Medium (MEM)	GibcoBRL
N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Sigma
N, N'-Methylen-bis-acrylamid, 2 x krist.	Sigma
Natriumacetat, wasserfrei, p.A.	Merck
Natriumchlorid, p.A.	Riedel De Haën
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat, p.A.	Riedel De Haën
Natriumhydroxid, chem. Rein	Riedel De Haën
Natriumselenit, p.A.	Sigma
Nerve Growth Factor (mNGF 7S)	Almone Labs
Nuclear Researcher Emulsion (Fotoemulsion Typ K.2)	Ilford
Pepstatin A	Sigma
Pepton aus Casein	Carl Roth
<i>p</i> -Phenylendiamin	Sigma
Progesteron, für Zellkultur	Sigma
Putrescin, für Zellkultur	Sigma
tATP	Boehringer Mannheim
rCTP	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasenpuffer A, B, L, M, H (10x)	Boehringer Mannheim

rGTP	Boehringer Mannheim
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Sigma
Roti®-Nanoquant	Carl Roth
rUTP	Boehringer Mannheim
Salzsäure 37%, p.A.	Merck
TeNT FC-FITC	List Biological Labs
SDS-PAGE Standards, prestained, broad range	BioRad
Thioethanol, p.A.	Merck
Transferrin, für Zellkultur	Sigma
Triiodothyronin, für Zellkultur	Sigma
Trikaliumphosphat, p.A.	Merck
Trypsin, aus Rinderpankreas	Sigma
Uridin, p.A.	Serva

Die Zellkulturmedien wurden aus Stammlösungen hergestellt, die aliquotiert und bis zur Verwendung bei – 20 °C gelagert wurden.

Stammlösung	Konzentration	Herstellung
BSA	1 mg/ml	BSA 1 mg/ml in H <sub>2</sub> O (bidest.) lösen, sterilfiltrieren
NGF	20 µg/ml	NGF 20 µg/ml in BSA-Stammlösung (1 mg/ml) lösen
Transferrin	10 mg/ml	Transferrin 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O (bidest.) lösen, sterilfiltrieren
Putrescin	3,22 mg/ml	Putrescin 3,22 mg/ml in H <sub>2</sub> O (bidest.) lösen, sterilfiltrieren
Insulin	1 mg/ml	Insulin 1 mg in 970 µl H <sub>2</sub> O (bidest.) geben, 30 µl Eisessig zugeben, durch vorsichtiges Schütteln lösen, sterilfiltrieren
Triiodothyronin	20 µg/ml	Triiodothyronin 1 mg in 1 ml NaOH 1 mol/l lösen, 49 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) zugeben, sterilfiltrieren
Progesteron	20 µg/ml	Progesteron 1 mg in 1 ml Ethanol (abs.) lösen, 49 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) zugeben, sterilfiltrieren
Corticosteron	20 µg/ml	Corticosteron 1 mg in 1 ml Ethanol (abs.) lösen, 49 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) zugeben, sterilfiltrieren
Natriumselenit	20 µg/ml	Natriumselenit 20 µg/ml in H <sub>2</sub> O (bidest.) lösen, sterilfiltrieren
FUDR mit Uridin	2 mg/ml FUDR und 5 mg/ml Uridin	FUDR 2 mg/ml und Uridin 5 mg/ml in H <sub>2</sub> O (bidest.) lösen, sterilfiltrieren

Aus den Stammlösungen wurde ein Medienzusatz (N3) zusammengestellt, der aliquotiert bei – 20 °C gelagert und dem kommerziell erhältlichen Grundmedium direkt vor der Verwendung zugesetzt wurde.

Die N3-Lösung besteht aus:

1,0 ml	BSA-Stammlsg.
1,0 ml	Transferrin-Stammlsg.
1,0 ml	Putrescin-Stammlsg.
200 µl	Insulin-Stammlsg.

10,0 ml	Triiodothyronin-Stammlsg.
3,125 ml	Progesteron-Stammlsg.
1,0 ml	Corticosteron-Stammlsg.
100 µl	Natriumselenit-Stammlsg.
auf 20 ml	mit H <sub>2</sub> O bidest. auffüllen,
	1 ml Aliquots bei -20°C lagern

Es wurden insgesamt 3 Medien (MEM 1, MEM 2, MEM 1FU) verwendet, die von einem kommerziellen Standardmedium (MEM 0) ausgehend wöchentlich frisch hergestellt wurden.

Standardmedium (MEM 0):

MEM-Pulvermedium (für 1 l Medium, Gibco) wurde in ca. 800 ml H<sub>2</sub>O bidest. aufgelöst. Nach Zugabe von 2,2g NaHCO<sub>3</sub>, 29,5 mg FUDR und 73,26 mg Uridin wurde der pH-Wert auf 7,3 eingestellt und das Volumen mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l aufgefüllt. Das Medium wurde sterilfiltriert und bei + 4 °C maximal 4 Wochen gelagert.

Die FUDR-Endkonzentration liegt bei 30 µg/ml, die Uridin-Endkonzentration bei 75 µg/ml.

Minimal Essential Medium 1 (MEM 1):

Das Standardmedium (MEM 0, s.o.) wurde unmittelbar vor der Verwendung in der Zentralkammer des 3-Kammer-Kultursystems (auf den Zellsomata) mit folgende Zusätzen versehen:

	100 ml	MEM 0
+	10 ml	Fetales Calve Serum (FCS)
+	2 ml	N3 (Zusammensetzung siehe oben)

Dieser Ansatz wurde in 2 Portionen zu 30 und 82 ml aufgeteilt.

Die 82 ml - Portion wurde zu MEM 1 (niedrige NGF-Konzentration), die 30 ml – Portion wird zu MEM 2 (erhöhte NGF-Konzentration) verarbeitet.

Die 82 ml Medium wurden mit 100 µl der aliquotierten NGF-Lösung (20 µg/ml in BSA-Lösung 1 mg/ml) versetzt. Die NGF-Endkonzentration des MEM 1 beträgt damit ca. 25 ng/ml.

Minimal Essential Medium 1 mit erhöhter Konzentration von FUDR und Uridin (MEM 1FU):

Für die Hemmung des Wachstums der nichtneuronalen Zellen wurde der SC-Kultur beim ersten Medienwechsel nach dem 3. bis 4. Tag ein FUDR- und Uridin-anreichertes MEM 1 zugesetzt.

Dieses wurde direkt vor der Verwendung aus 50 ml MEM 1 durch Zusatz von 0,5 ml der FUDR / Uridin-Stammlösung (FUDR 2 mg/ml, Uridin 5 mg/ml) hergestellt.

Die FUDR-Endkonzentration liegt bei 50 µg/ml, die Uridin-Endkonzentration bei 125 µg/ml.

Minimal Essential Medium 2 (MEM 2):

Die 30 ml Medium wurden mit 300 µl der aliquotierten NGF-Lösung (20 µg/ml in BSA-Lösung 1 mg/ml) versetzt. Die NGF-Endkonzentration des MEM 2 beträgt damit 200 ng/ml.

Der Nerve Growth Factor stellt eine für die Differenzierung und das Wachstum von Hinterwurzelganglien-Zellen (DRG-Zellen) essentielle Substanz dar. Durch das Befüllen der Zentralkammer mit MEM 1 (ca. 25 ng/ml NGF) und der Seitenkammern mit MEM 2 (200 ng/ml NGF) resultiert ein NGF-Verhältnis von ca. 1 zu 8.

In entsprechenden Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass ohne Gradient nur selten ein Durchwachsen der Neurone unter der Barriere zu beobachten ist, der positive, längenwachstumsfördernde und richtungsgebende Effekt lässt sich jedoch auch bei einem NGF-Verhältnis von größer als 1 zu 8 nicht steigern.

Für die Präparation der Zellen wurde Dulbecco's PBS als Aufbewahrungslösung zur Zwischenlagerung des präparierten Gewebes vor der Trypsinisierung und Dissoziation benötigt. In einer  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -freien Variante wurde Dulbecco's PBS als Trypsinisierungsmedium genutzt. Die Lösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

Dulbecco's PBS (mit  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ , Aufbewahrungslösung)

NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	1,44 g/l
$KH_2PO_4$	0,20 g/l
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	132 mg/l
$MgCl_2 \times 6 H_2O$	100 mg/l
D-Glucose	5,00 g/l

Der pH-Wert liegt bei pH 7,5, die Osmolarität vor der Glucosezugabe bei ca. 295 mosmol.

Dulbecco's PBS (ohne  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ , Trypsinisierungslösung)

NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	1,44 g/l
$KH_2PO_4$	0,20 g/l
D-Glucose	5,00 g/l

Der pH-Wert liegt ebenfalls bei pH 7,5, die Osmolarität vor der Glucosezugabe bei ca. 295 mosmol.

Die Puffer wurden bei + 4 °C gelagert.

### 2.3 Natives Tetanustoxin

Das native Tetanusneurotoxin (TeNT) wurde nach der Beschreibung von Weller (Weller et al. 1987) wie folgt gereinigt:

Als Ausgangsmaterial lagen 425 ml Bakterien-Kultur-Konzentrat der Firma Behring vor, dem die Protease-Inhibitoren Diisopropylfluorophosphat (DFP, 1 mmol/l Endkonz.) und Benzamidin (10 mmol/l Endkonz.) zugesetzt waren. Die Proteine wurden mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gefällt (Endkonzentration von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40 % (w/v), Endkonzentration DFP 600  $\mu\text{mol/l}$ ) und 16 Stunden bei + 4 °C gelagert.

Das abzentrifugierte Pellet (10.000 RPM in Rotor GS3, 20 min) wurde in 350 ml eines TRIS Puffers (BIS-TRIS 20 mmol/l, NaCl 2 mol/l, Na-Citrat 0,1 mol/l, Benzamidin 20 mmol/l, EDTA 10 mmol/l, DFP 0,5 mmol/l, pH 6,5) bei + 4 °C resuspendiert (Magnetrührer) und erneut zentrifugiert (13.000 RPM in GS3, 30 min). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet verworfen.

Die so gewonnene TeNT-Lösung (ca. 320 ml, bräunliche Farbe, fast klar) wurde auf eine äquilibrierte Phenylsepharose FF-Säule (38 × 5,0 cm, Kühlung + 4 °C) gepumpt (Schlauchpumpe LKB). Bereits nach kurzer Zeit wurden farbige Bereiche auf der Säule erkennbar. Über Nacht wurde mit TRIS-Puffer (Schlauchpumpe LKB; 2 l Puffer in 14 h) gespült.

Nach dem Spülen wird unter Kühlung mit Elutionspuffer (NaCl 10 mmol/l, EDTA 2 mmol/l, Benzamidin 5 mmol/l, pH 7,2) eluiert. Nachdem rund 600 ml Vorfraktion aufgefangen worden waren, wurden einzelne Fraktionen (Fraktionsvolumen ca. 40 ml) gewonnen. Beim Eluieren ließ sich eine erneute Zonenbildung auf der Säule beobachten. Nach dem praktisch alle farbigen Säulenanhaltungen eluiert worden waren, wurde eine **Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese** (SDS-PAGE) der einzelnen Fraktionen durchgeführt.

Die hier und im Folgenden beschriebenen Gelelektrophoresen wurden mit einer BioRad Mini Protean® Elektrophoresekammer durchgeführt. Die SDS-PA Gele wurden als kombiniertes Sammel- und Trenngel gegossen, das Trenngel hatte i.d.R. eine Polyacrylamidkonzentration von 10 %. Als Markergemisch wurde der BioRad SDS-PAGE Standard (Broad Range, 7,4 - 200 kD) verwendet. Der Probenpuffer wurde mit bzw. ohne Zusatz von Thioethanol eingesetzt.

Probenpuffer für Proteingele (4 x) - nicht reduzierend -	Probenpuffer für Proteingele (4 x) - reduzierend -
25 mM Tris/HCl, pH 6,75	25 mM Tris/HCl, pH 6,75
40 % (w/v) Glycerin	40 % (w/v) Glycerin
8 % (w/v) SDS	8 % (w/v) SDS
0,004 % (w/v) Bromphenolblau	0,004 % (w/v) Bromphenolblau
	20 % (v/v) Thioethanol

Die Proteinlösungen wurden mit 50 % des Probevolumens an 1-fach Probenpuffer für Proteingele versetzt, und vor dem Einfüllen in die Geltaschen 10 Minuten bei 95°C denaturiert.

Das 0,75 mm dicke Gel setzt sich aus einem ca. 1 cm hohen Sammelgel und einem ca. 5 cm hohen Trenngel. Das nach etwa einer Stunde auspolymerisierte Gel wurde sofort oder an den nächsten Tagen verwendet; die Lagerung erfolgte bei + 4 °C, abgedeckt mit feuchten Tüchern in einer Plastiktüte.

Die Monomerlösungen für die unterschiedlichen Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel	10 %	12,5 %	15 %
30 % AA-Bis-Mix 29:1	3,34 ml	4,20 ml	5,10 ml
1 M Tris pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Dest. H <sub>2</sub> O	2,90 ml	1,85 ml	0,68 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl

Sammelgel	6,3 %
30 % AA-Bis-Mix 29:1	0,50 ml
1 M Tris pH 6,8	0,38 ml
Dest. H <sub>2</sub> O	2,10 ml
10 % SDS	25 µl
TEMED	10 µl
10 % APS	50 µl



Die 30 %ige Acrylamid- / Bisacrylamidlösung bestand aus Acrylamid 29 % (w/v) und N'-N'-Methylenbisacrylamid 1 % (w/v) in Wasser, die Haltbarkeit (Lagerung im Dunkeln bei + 4 °C) der Lösung beträgt ca. einen Monat.

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung 150 V durchgeführt, bis der Farbmarker des Probenpuffers das Ende des Trenngels erreicht hatte.

Der Laufpuffer bestand aus Tris 25 mmol/l, Glycin 250 mmol/l und SDS 0,1 % (w/v) in dest. Wasser.

Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Blue (0,1 % Coomassie Blue R 250 in 45 % (v/v) Ethanol, 45 % (v/v) H<sub>2</sub>O, 10 % (v/v) Essigsäure), Entfärbelösung gleiche Zusammensetzung ohne Coomassie Blue.

(Auf Verfahrensweisen, die von diesem Standard abweichen, wird im Text entsprechende hingewiesen; ohne weitere Erläuterungen wurde die SDS-PAGE wie oben beschrieben durchgeführt.)

Die toxinhaltigen Fraktionen 4 bis 13 wiesen eine leicht bis deutlich bräunliche Färbung auf. Sie wurden zu einem Gesamtvolumen von etwa 420 ml vereinigt, 50 µl DFP (Endkonzentration ca. 300 µmol/l) zugesetzt und mehrere Tage in der Kälte gegen Puffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mmol/l, EDTA 2 mmol/l, Benzamidin 5 mmol/l, pH 7,2) dialysiert, um . Das Dialysat hatte nach 4 Tagen ein Gesamtvolumen von ca. 390 ml.

Für eine anschließende ionenchromatographische Reinigung des dialysierten TeNT wurde eine Säule (Säulenvolumen ca. 1240 ml) mit DE 52 gepackt und mit Puffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mmol/l, EDTA 2 mmol/l, Benzamidin 5 mmol/l, pH 7,2) äquilibriert. Das Toxin (nach der Dialyse ca. 390 ml Lösung) wurde aufgetragen, die Säule wurde anschließend mit 1,5 l des Ausgangspuffers gespült.

Es wurden unter einem Gradientenprogramm (Startpuffer s.o.) zu einer Endkonzentration von NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 500 mmol/l eluiert. Die gesammelten Fraktionen (jeweils ca. 9 ml) wurden gelchromatographisch (SDS-PAGE) überprüft.

Die toxinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, das Toxin lag danach in einer Lösung (156 ml) in einer Konzentration von etwa 17,6 mg/ml vor, was einer

Toxingesamtmenge von ca. 2,7 g entspricht. Die Proteinlösung (Abb. 5) wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und tiefgekühlt gelagert.



Abb. 5: SDS-PAGE des aufgereinigten nativen TeNT ( $c = 17,6 \text{ mg/ml}$ )  
(12,5 %iges Gel, 1  $\mu\text{l}$  Probenvolumen, CB-Färbung  
Probenpuffer ohne Thioethanol (linke Bande) und  
mit Thioethanol (rechte Bande)

Die Konzentrationen der nativen Toxine und Fragmente wurden mit dem Roti®-Nanoquant-Assay (Roth) ermittelt. Das Verfahren beruht auf der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford (Bradford 1976) mit der Variation nach Zor und Selinger (Zor et al. 1996). Bei diesem kommerziellen Assay wird die Extinktion der entsprechend verdünnte Probenlösung nach der Färbung mit Commassie blue gegen Wasser bei 590 und 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt als Quotient  $E_{590}/E_{450}$  gegenüber einer entsprechenden Kalibrationsgeraden. Um eine Vergleichbarkeit zu dem anderen Bestimmungsverfahren zu gewährleisten, wurde ebenfalls BSA als Kalibrationsprotein eingesetzt. Die ohne Abänderung nach der Versuchsvorschrift des Assays erstellten Kalibrationsgeraden hatten nach linearer Regression immer einen  $r^2 > 0,998$  (nach Doppelbestimmung mit Mittelwertbildung).

Das native TeNT wurde wie unter 2.5 beschrieben auf verschiedene Arten für die Experimente markiert.

## 2.4 Rekombinante Tetanustoxine

Die Produktion der rekombinanten Toxine und Fragmente erfolgte in Kooperation mit zwei anderen Arbeitsgruppen und einem kommerziellen Anbieter.

Ein fluoreszenzmarkiertes Fragment (natives Fragment C markiert mit FITC) wurde freundlicherweise von Frau Linda Shoer, PhD, List Labs, zur Verfügung gestellt.

Von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Jürgen Frevert, BioTeCon, Potsdam, wurden freundlicherweise zwei rekombinante Fragmente der schweren Kette (34 AS vom C-terminalen Ende der schweren Kette, Hc<sub>1281-1315</sub>TeNT-His<sub>6</sub>, mit und ohne Konjugation von GFP) zur Verfügung gestellt.

In Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Chem. Andreas Rummel, AG Binz, Abt. Physiologische Chemie der MHH, wurden alle weiteren aufgeführten rekombinanten Toxine und Fragmente hergestellt. Sie sind ebenfalls Teil der Diplomarbeit bzw. Dissertation von Herrn A. Rummel, aus der die im Folgenden beschriebenen Methoden entnommen wurden.

Die Expression von *His<sub>6</sub>-tag*- und *Strep-tag<sup>®</sup> II*-Proteinen erfolgte in *E. coli* M15 [pREP4]. *E. coli* M 15 [pREP4] wurde für die Expression von rekombinanten TeNT-Derivaten im pQE-3-Vektor verwendet. *E. coli* M15 [pREP4] basiert auf dem *E. coli*-Stamm K12. Die Zellen enthalten schon das Repressions-Plasmid pREP4. Dieses codiert neben einer Kanamycin-Resistenz noch für den *lac*-Repressor, wodurch die für die effiziente Repression von auf pQE-Vektoren codierten Genen notwendige hohe Konzentration an lac-Repressor zur Verfügung steht.

Genotyp: *nal<sup>S</sup> str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>+</sup> recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup>*

A Oligonukleotide zur Amplifikation

Die nicht an die Template-DNA bindenden Basen sind kursiv gedruckt.

BamH I FW 709-730

5'-*CTC TGG ATC* CAG TAA TAG CTT TAA TG-3'

fett gedruckt: **BamH I**-Erkennungssequenz

Sma I RW 1456-1433

5'-*CTC TCC CGG GTT* CTT GTG AAA TGC TAT CTT TAT C-3'

fett gedruckt: **Sma I**-Erkennungssequenz

Sma 2 RW 1579-1559

5'-*CTC TCC CGG GTA* GTG GAT CTA CTA TTT CAG G-3'

fett gedruckt: **Sma I**-Erkennungssequenz

Sma 3 RW 1822-1802

5'-*CTC TCC CGG GAC* CTG CTT GAA CAC CTT TAT T-3'

fett gedruckt: **Sma I**-Erkennungssequenz

Sma 4 RW 1972-1949

5'-*CTC TCC CGG GAT* TTC CCC TTA ATG CTG AAT TTC-3'

fett gedruckt: **Sma I**-Erkennungssequenz

Sma 5 RW 2062-2042

5'-*CTC TCC CGG GAA* AGG TAA ATA CAC CGA GTG C-3'

fett gedruckt: **Sma I**-Erkennungssequenz

Sma 6 RW 2293-2270

5'-*CTC TCC CGG GAT* CAC TTC CTG AGT ATT TTT TAT A-3'

fett gedruckt: **Sma I**-Erkennungssequenz

Sma 7 RW 2503-2478

5'-*CTC TCC CGG GAA* TAT TAT GAC TAT CTA TAA GAT TAA-3'

fett gedruckt: **Sma I**-Erkennungssequenz

Sma 8 RW 2638-2612

5'-*CTC TCC CGG GAA* TAC TAT TGA AAT ATT CAT TAA TTA T-3'

fett gedruckt: **Sma I**-Erkennungssequenz

Sma 9 RW 2974-2951

5'-*CTC TCC CGG GTT* GTA AAA TCC ATT CTA TAT TGC C-3'

fett gedruckt: **Sma I**-Erkennungssequenz

Sma 10 RW 3325-3303

5'-**CTC TCC CGG** GCA AAG GAT TTC CCC AAT AAT CTT-3'

fett gedruckt: **Sma** I-Erkennungssequenz

AR 5HCD2 FW 1637-1663

5'-**TCT CTT GAT CAG** CCA TGG ATG ATA TTA CTA AAT ATG TTG ATT AT-3'

fett gedruckt: **Bcl**I-Erkennungssequenz, unterstrichen: **Nco**I-Erkennungssequenz

5HCD3 FW 2632-2656

5'-**TCT CTT GAT CAG** CCA TGG CTA GTA TTA ATG ATT CAA AAA TTT TG-3'

fett gedruckt: **Bcl**I-Erkennungssequenz, unterstrichen: **Nco**I-Erkennungssequenz

SBN-HC-RV 3874-3851

5'-**TCT CTC GGT CTC AGC GCT** CCC GGG **AGT TGG GGG** CTC TAC CCA TCC  
TGG GTC CCT AG-3'

fett gedruckt: **Bsa**I-Erkennungssequenz, unterstrichen: **Sma**I-Erkennungssequenz

B Oligonukleotide zur Einführung von Oligopeptidsequenzen

**Strep**-tag<sup>®</sup>II mit einem glattem Ende und **Hind** III-3'-Überhang

Strep II For

5'-GCT TGG AGC CAC CCG CAG **TTC GAA** AAA TAA TA-3'

A W S H P Q F E K •

fett gedruckt: **Bst**B I-Erkennungssequenz

Strep II Rev

5'-AGC TTA TTA TTT **TTC GAA** CTG CGG GTG GCT CCA AGC-3'

fett gedruckt: **Bst**B I-Erkennungssequenz

**Strep**-tag<sup>®</sup>II mit einem glattem Ende und **Pst** I-3'-Überhang inkl. IGase-Erkennungssequenz

Strep 2 FW

5'-CCG ACT CCC GGG TGG AGC CAC CCG CAG **TTC GAA** AAA TAA CTG CA-3'

P T P G W S H P Q F E K •

fett gedruckt: **Bst**B I-Erkennungssequenz, unterstrichen: **Sma**I-Erkennungssequenz

Strep 2 RW

5'-GTT ATT **TTT CGA** ACT GCG GGT GGC TCC ACC CGG GAG TCG G-3'

fett gedruckt: **Bst**B I-Erkennungssequenz, unterstrichen: **Sma**I-Erkennungssequenz

## His<sub>6</sub>-tag-Proteine

Proteine können am N- bzw. C-Terminus durch Klonierung um die Aminosäuresequenz HisHisHisHisHisHis, abgekürzt His<sub>6</sub>, verlängert werden. Die His<sub>6</sub>-Aminosäuresequenz bildet hochaffine Chelatkomplexen mit zweifach positiv geladenen Schwermetallionen wie Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> oder Ni<sup>2+</sup> aus. Unter Verwendung von über den chelatisierenden Linker Nitrilotriacetic acid (NTA) an Agarose immobilisierten Ni<sup>2+</sup> kann das Protein gereinigt werden. Dabei bindet das Protein über jeweils 2 Histidinreste an ein Ni<sup>2+</sup>-Ion, wodurch ein oktaedrischer Komplex entsteht. Durch die Verwendung von 6 Histidinresten, die an drei benachbarte Ni<sup>2+</sup>-Ionen der Ni-NTA-Agarose binden, kann das Protein von anderen histidinreichen Proteinen durch Elution mit einem Gradienten getrennt werden. (Abb. 6) Die Elution kann durch Verdrängung mit Imidazol oder durch Protonierung der leicht basischen Histidinreste erfolgen. Dabei ist sowohl eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen bei + 4 °C als auch unter denaturierenden Bedingungen möglich.

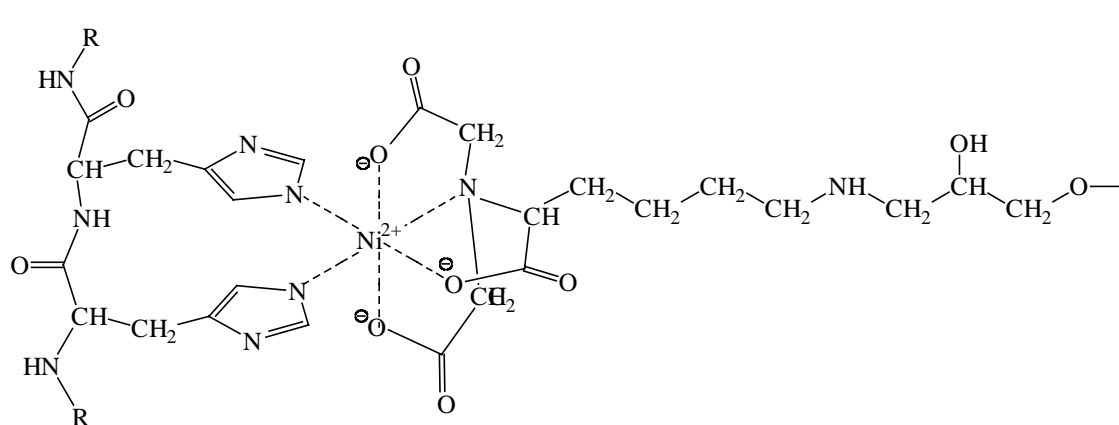


Abb. 6: Interaktion benachbarter Histidinreste mit Ni-NTA-Agarose.  
(entnommen aus *The QIAexpressionist*, 1997, Qiagen)

## Induktion der E. coli M15 pREP4-Kultur

Die Induktion der E. coli M15 pREP4-Kultur wurde in der Regel nach folgendem Schema durchgeführt: 2 ml 2YT-Medium mit Antibiotikazusatz (M15 pREP4: 100 µg/ml Ampillicin & 25 µg/ml Kanmycin) wurden angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Am Folgetag wurden aus dieser Vorkultur eine 250 ml Kultur aus 2YT-Medium mit Antibiotikum 1 : 100 angeimpft.

Die verwendeten Medien enthielten gelöst in H<sub>2</sub>O bidest. die folgenden Inhaltsstoffe:

2YT-Platten (1 l)	16 g Pepton
	10 g Hefeextrakt
	5 g Natriumchlorid
	15 g Bacto-Agar
2YT-Medium (1 l)	16 g Pepton
	10 g Hefeextrakt
	5 g Natriumchlorid

Das fertig angesetzte Medium wurde autoklaviert.

Diese Kultur wuchs bei 37°C und 180 rpm bis zu einer Extinktion von 0,8 - 0,9 bei 600 nm, bevor die Expression des His<sub>6</sub>-tagged-Proteins durch Zugabe von 1 M Isopropyl-thio-D-Galactopyranosid-Lösung (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert wurde. Vor und während der Induktion wurden 2 ml Aliquots aus der Kultur entnommen, um später auf einem SDS-Polyacrylamidgel den zeitlichen Verlauf der Expression verfolgen zu können. Nach 3 h Induktion der Proteinexpression wurde die Bakteriensuspension 20 min bei 5000 rpm und + 4 °C abzentrifugiert (GSA- bzw. GS-3-Rotor, RC2-B, Sorvall Superspeed). Das Pellet wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei - 20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen der Pellets wurde jedes in Ultraschallpuffer (SB) resuspendiert. Um die Proteolyse des exprimierten Proteins zu verhindern, wurden die *E. coli*-eigenen Proteasen mit Benzamidin (1 M), PMSF (0,2 M) und Pepstatin A (0,5 mg/ml) inhibiert. Da die Clostridientoxine Zn-Metalloprotease sind, durfte kein Chelatbildner zu Komplexierung anderer M<sup>2+</sup> zugesetzt werden.

Die resuspendierten Zellen wurden im Eisbad mit Ultraschall aufgebrochen (2 x 90 s, Duty cycle 50 % dazwischen 1 x 60 s Pause oder 5 min Duty cycle 30 %, jeweils 50 W; Branson Sonifier 250). Anschließend wurden die Zelltrümmer 20 min bei 15000 rpm und + 4 °C abzentrifugiert (SS-34-Rotor, RC2-B, Sorvall Superspeed). Cytosolische Proteine, unter anderem das rekombinante Protein, verblieben dabei im Überstand. Für eine Kontrolle wurde das Pellet in 8 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen. Ein Aliquot dieser Probe wurde mit 2-fach

Probenpuffer für Proteingele versetzt und bei - 20 °C gelagert. Aus dieser Kontrolle wurde nach Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels ersichtlich, ob das exprimierte Protein durch die Bildung von Einschlusskörpern oder ungenügendem Zellaufschluß in das Pellet gelangt war, oder ob es sich in löslicher Form im Cytosol befand und durch die Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt werden konnte. Um auch sehr kleine Zelltrümmer und ungelöste Bestandteile, welche die Affinitätschromatographiesäule leicht verstopfen können, zu entfernen, wurde der Überstand in einem Ti70-Rotor ultrazentrifugiert (1 h, 50.000 rpm, + 4 °C, L8-70 M Ultrazentrifuge, Beckman).

#### Aufreinigung durch Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

600 µl 50 % iger Ni-NTA-Agarose-Suspension (Qiagen) wurde in eine leere Säule (Biorad) überführt und mit 10 ml Ultraschallpuffer äquilibriert. Das ultrazentrifugierte Bakterienlysat wurde bei + 4 °C auf die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Die Säule wurde zuerst mit 30 ml Ultraschallpuffer gewaschen, um unselektiv gebundene Proteine und andere Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule mit 6 ml 10 mM Imidazol enthaltendem Ultraschallpuffer gewaschen, wodurch Histidin-cluster enthaltende Proteine entfernt wurden. Die Elution erfolgte in mehreren Fraktionen mit jeweils 0,5 ml 100 mM Imidazol in Ultraschallpuffer. Vom Säulendurchfluss, den Waschfraktionen sowie den Eluaten wurden jeweils Proben mit 4-fach Probenpuffer versetzt und 10 µl auf einem SDS-Acrylamidgel analysiert. Die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, in einen Dialyseschlauch gefüllt und dreimal ca. 6 Stunden gegen den später benötigten Puffer dialysiert.

#### Ultraschallpuffer:

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8,0 (mit HCl eingestellt)

#### Aufreinigung durch Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Unter denaturierenden Bedingungen können auch im Cytosol unlösliche oder aufgrund vorhandener hydrophober Transmembrandomänen in Membranen lokalisierte Proteine, welche unter nativen Bedingungen mit den Zelltrümmern sedimentieren würden, mit guten Ausbeuten aufgearbeitet werden. Die



Durchführung basiert auf Protokoll 14 des Handbuchs *The QIAexpressionist, Handbook for high-level Expression and Purification of 6xHis-tagged Proteins* (1997, Qiagen). Hierzu wurde das Bakterienpellet in 10 ml Puffer A resuspendiert und bei RT 2 h invertiert, so dass die Zellen aufgeschlossen werden. Anschließend wurden die Zelltrümmer 20 min bei 15000 rpm und + 4 °C abzentrifugiert (SS-34-Rotor, RC2-B, Sorvall Superspeed). Cytosolische Proteine, unter anderem das rekombinante Protein, verblieben dabei im Überstand. Das Bakterienlysat wurde danach mit 600 µl äquillibrierter  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (Qiagen) 1 h bei Raumtemperatur in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine leere Säule (Biorad) überführt und mit 10 ml Puffer A gewaschen. Anschließend wurde zum Entfernen des Guanidiniumhydrochlorids mit 10 ml Puffer B gewaschen. Durch Waschen mit 5 ml Puffer C konnte durch eine Erniedrigung des pH-Wertes unselektiv gebundenes Protein entfernt werden. Anschließend wurde die Säule mit Puffer D gewaschen: 5 ml 20 mM Imidazol enthaltenden Puffer C, wodurch Histidin-cluster enthaltende Proteine entfernt wurden. Die Elution erfolgte in 6 Fraktionen mit jeweils 0,5 ml 250 mM Imidazol in Puffer C. Vom Säulendurchfluss, den Wasch- sowie den Elutionsfraktionen werden jeweils Kontroll-Proben mit 4-fach Probenpuffer versetzt und auf einem SDS-Acrylamidgel analysiert.

Puffer A:

6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Puffer B:

8 M Harnstoff, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Puffer C:

8 M Harnstoff, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM Tris/HCl, pH 6,3

Puffer D:

8 M Harnstoff, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris/HCl, pH 6,3, 20 mM Imidazol

Puffer E<sub>H</sub>:

8 M Harnstoff, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris/HCl, pH 6,3, 250 mM Imidazol

Der pH-Wert der harnstoffhaltigen Puffer wurde kurz vor Verwendung überprüft und eingestellt.

### ***Strep***-tag<sup>®</sup>II-Proteine

***Strep***-tag (AWRHPQFGG) und ***Strep***-tag<sup>®</sup>II (WSHPQFEK) sind Oligopeptide, die von Streptavidin gebunden werden. Die Dissoziationskonstante von ***Strep***-tag an Streptavidin ist mit  $K_D=18\ \mu\text{M}$  doppelt so groß wie die von ***Strep***-tag<sup>®</sup>II. Allerdings kann ***Strep***-tag aufgrund einer Salzbrücke zwischen dem Arginin 84 des Streptavidins und der negativ geladenen Carboxylgruppe des Proteins nur am C-Terminus eines Proteins eingesetzt werden, während ***Strep***-tag<sup>®</sup>II sowohl am N-Terminus, zwischen zwei Proteinen, als auch am C-Terminus verwendet werden kann. Durch Zufallsmutagenese ist der Streptavidin-Komplex so modifiziert worden, dass die  $K_D$  von ***Strep***-tag<sup>®</sup>II nur noch  $1\ \mu\text{M}$  beträgt. Der modifizierte Komplex heißt StrepTactin<sup>®</sup> und bindet auch den ersten ***Strep***-tag mit höherer Affinität als Streptavidin. StrepTactin<sup>®</sup> ist auf Sepharose-Kügelchen immobilisiert und kann als Säulenfüllmaterial zur Proteinaufreinigung eingesetzt werden. Durch strukturverwandte Moleküle des Biotins, dem natürlichen Bindungspartner des Streptavidins, wie z. B. Iminobiotin, Diaminobiotin oder Desthiobiotin kann das gebundene Protein eluiert werden. Die Stärke der Wechselwirkung von Desthiobiotin mit StrepTactin<sup>®</sup> liegt zwischen dem von Diaminobiotin und Biotin, so dass zum einen die Elution des gebundenen Proteins in kleinen Fraktionen möglich ist, und zum anderen das Säulenmaterial durch Zugabe von 2-[4'-Hydroxybenzenazo]-benzoesäure (HABA) regeneriert werden kann. 1 mM HABA-Lösung ist gelb; durch das Verdrängen des Desthiobiotins vom StrepTactin<sup>®</sup> durch das HABA-Molekül wird dieses zum Hydrazon-Isomer reduziert und zeigt eine rote Farbe, anhand deren Intensität der Regenerationsgrad der Säule bestimmt werden kann. Durch einfaches Waschen mit 100 mM Tris/HCl (Puffer W) wird auch das HABA entfernt und die Säule ist wieder benutzbar.

### Induktion der *E. coli* M15 pREP4-Kultur/TG1

2 ml 2YT-Medium mit Antibiotikazusatz (pQE-3-Vektor in M15 pREP4: 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampillicin & 25  $\mu\text{g/ml}$  Kanmycin, pASK75 II-Vektor in TG1: 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampillicin) werden angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde aus dieser Vorkultur eine 250 ml Kultur aus 2YT-Medium mit Antibiotikum 1 : 100 angeimpft. Diese Kultur wuchs bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer Extinktion von 0,8 - 0,9 bei 600 nm, bevor die Expression des ***Strep***-tag<sup>®</sup>II - Proteins durch Zugabe von 125  $\mu\text{l}$  1 M Isopropyl-thio-D-Galactopyranosid-Lösung

(IPTG) beim pQE-3-Vektor oder 50 µl Anhydrotetracyclin (aTc in DMF: 1 mg/ml) beim pASK-Vektor induziert wurde.

Die Abtrennung der Zellen verlief wie bei der His<sub>6</sub>-tag-Aufarbeitung. Anschließend wurden die Bakterienpellets in einer entsprechenden Menge Puffer W resuspendiert. Die Zugabe der Inhibitoren ist ebenso wie der Ultraschallaufschluss und die Ultrazentrifugation identisch.

Die Bestimmung der Konzentration aufgereinigter rekombinanter Proteine erfolgte durch einen SDS-Gel zusammen mit einer BSA-Standardreihe. Von dem zu bestimmenden Protein wurden 2-3 Proben mit einem Volumen zwischen 0,5 und 5 µl sowie je 10 µl einer BSA-Standardreihe auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden mit Coomassie Blue R250 gefärbt, das Gel luftblasenfrei zwischen zwei 0,5 mm starke Kunststoffplatten gelegt und mit einem Sharp JX-325 High Resolution Color Scanner gescannt. Die einzelnen Proteinbanden des so erhaltenen Bildes wurden mit der Contour Band-Funktion des Softwareprogramms ImageMaster™ 1-D (Pharmacia Biotech) detektiert und integriert. Durch lineare Regression wird aus den so erhaltenen OD x mm<sup>2</sup>-Werten und den bekannten BSA-Konzentrationen eine Eichgerade erstellt, aus welcher, unter der Annahme der gleichen Coomassie-Färbbarkeit von BSA und dem zu bestimmenden Protein, die Konzentration des zu untersuchenden Proteins errechnet wurde.

Für Einzelheiten der notwendigen Polymerasekettenreaktion (PCR), Aufreinigung der PCR-Produkte, Restriktionsspaltung sowie Dephosphorylierung des Vektors und Phosphorylierung der Oligonukleotide wird an dieser Stelle nochmals auf die Dissertation von Herrn Andreas Rummel verwiesen. Auch die Aufreinigung und Identifikation der DNA-Fragmente, die Transformation der E.coli-Stämme nach der Methode von Dagert und Ehrlich (Dagert et al. 1979), sowie die Sequenzierung der gewonnenen Plasmid-DNA wird dort detailliert beschrieben.

In Tabelle 1 sind alle getesteten Konstrukte schematisch dargestellt. Es wurde noch eine Reihe weiterer Konstrukte erzeugt, die jedoch nicht am Zellkultursystem getestet wurden, da z.B. nicht ausreichende Mengen Protein exprimiert wurden oder die Identität der Konstrukte nicht eindeutig darstellbar war.

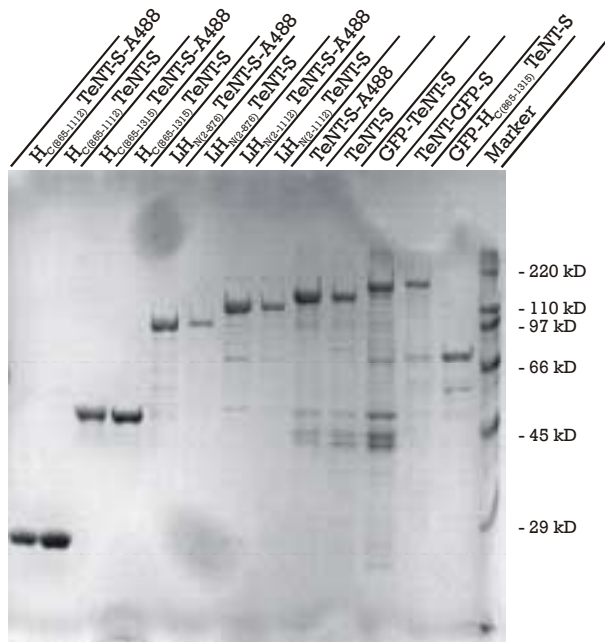


Abb. 7a: SDS-PAGE rekombinanter Proteine nach CB-Färbung.

Nicht-GFP-markierte Proteine wurden mit Alexa®488 markiert und hier jeweils paarweise neben dem unmarkierten Protein aufgetragen.

In Abb. 7 a und b sind SDS-PAGE verschiedener rekombinanter Fragmente dargestellt. Es wurden bei den nicht-GFP-markierten Fragmenten jeweils ein Paar aus Alexa®488-fluoreszenzmarkiertem und unmarkiertem Protein aufgetragen. Die Abbildung a wurde nach CB-Färbung aufgenommen, Abbildung b vor der Färbung unter UV-Licht 254 / 366 nm.

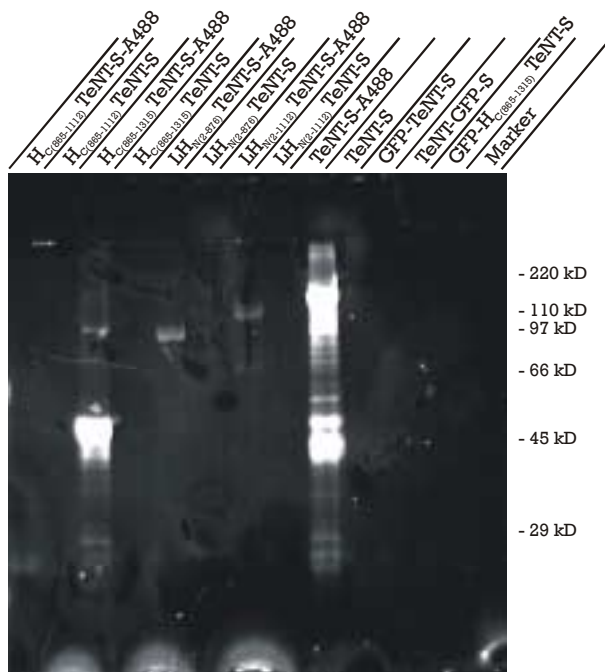
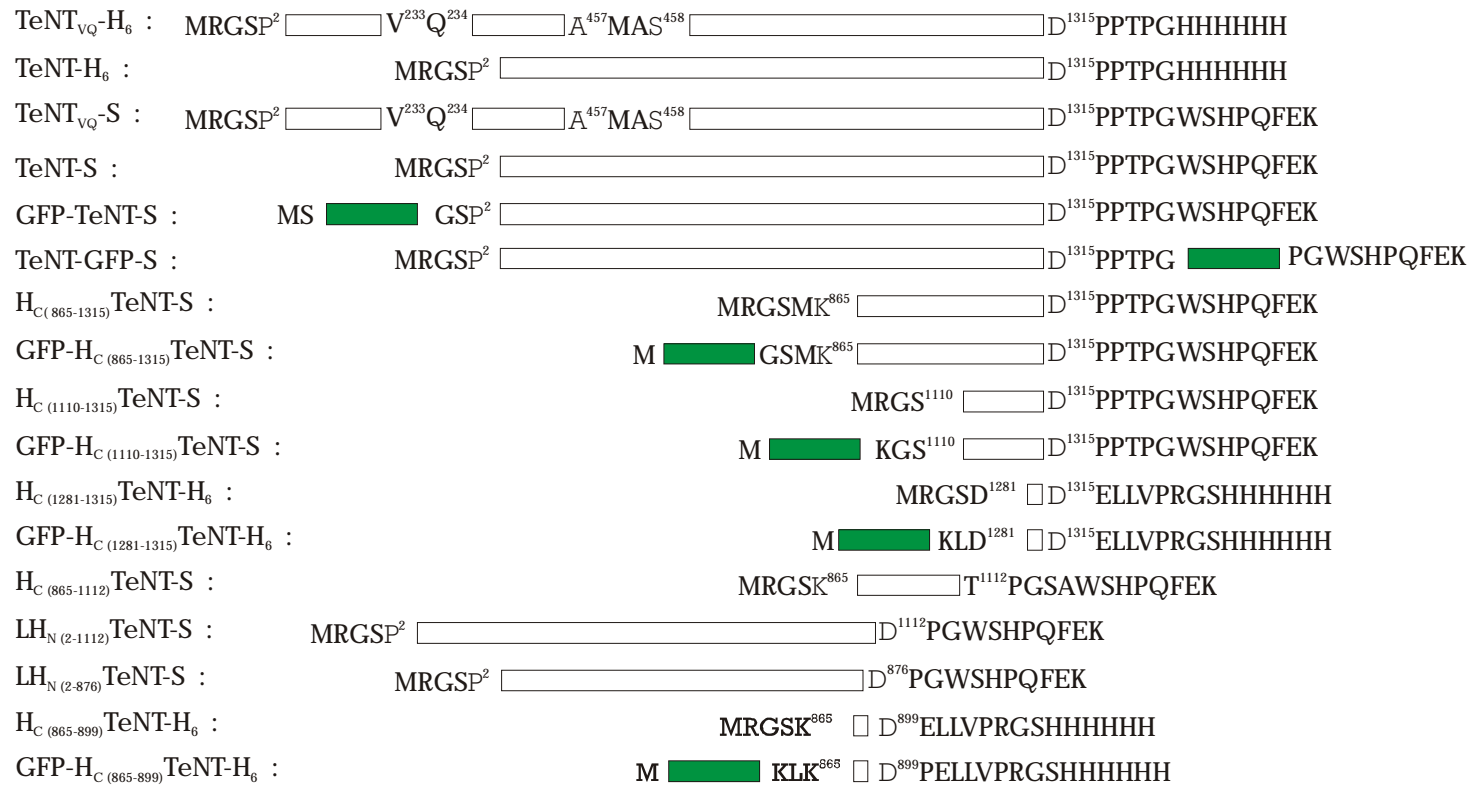


Abb. 7b: SDS-PAGE rekombinanter Proteine vor CB-Färbung, gleiches Gel wie in Abb. 7 a.

Tabelle 1: Schematische Darstellung der getesteten rekombinanten Tetanustoxine und TeNT - Fragmente



Die weißen Balken entsprechen der Primärstruktur des nativen TeNT, die grünen Balken der Struktur des Green Fluorescence Proteins (GFP). Es wurde der Ein-Buchstaben-Code für die Bezeichnung der AS verwendet. Bei den Kurzbezeichnungen wurden die gebräuchlichen Bezeichnungen für H<sub>C</sub> und H<sub>N</sub> unter Angabe der vorhandenen AS-Positionen verwendet. Der His<sub>6</sub>-tag wird als H<sub>6</sub> (mit Bindestrich), der StrepII-tag wird als S (mit Bindestrich) bezeichnet. Bei den Sequenzen wurde jeweils die erste bzw. letzte native AS genannt. Die relative Länge der Balken entspricht der Anzahl der in dem jeweiligen Fragment enthaltenen AS.

## 2.5 Derivatisierungsreaktionen

Um die eingesetzten Clostridientoxine und –fragmente nachzuweisen, wurden zwei unterschiedliche Derivatisierungsmethoden eingesetzt: Radioaktive Markierung mit Iod<sup>125</sup> und Fluoreszenzmarkierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen bzw. Proteinkonjugaten.

Die Iodierung erfolgte nach der Chloramin-T-Methode. In wässriger Lösung entstehen aus Chloramin-T (N-Chlor-p-Toluensulfonamid) die Hypochlorige Säure (HOCl), die ein verhältnismäßig mildes oxidierendes Agens in wässriger Lösung darstellt. Dieses oxidiert bei pH 7,5 in einem entsprechendem Reaktionsgemisch Iodid zu elementarem Iod, das unter diesen Bedingungen zu einer Iodierung von Tyrosin führt. Neben einer Monoiodierung ist auch die Bildung von Di-Iodo-Tyrosin möglich. Überschüssiges N-Chlor-p-Toluensulfonamid wird durch die Zugabe eines Reduktionsmittels (Natriumdisulfit, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) reduziert, dabei wird außerdem auch elementares Iod zu Iodid reduziert. Die Trennung des iodierten Proteins erfolgte über eine Einwegsäule mit Sephadex G25 coarse. Die detaillierte Arbeitsvorschrift ist der Literatur (Erdmann, G. und Habermann, E. 1977) zu entnehmen.

Während bei den meisten bekannten Iodierungsmethoden keine lösungsmittelhaltigen Phasen eingesetzt werden, arbeiten praktisch alle gängigen chemischen Fluoreszenzmarkierungsmethoden mit einer Lösungsmittelphase (z.B. TRITC in Aceton), was zu einer Denaturierung des gegenüber Lösungsmittel besonders empfindlichen TeNT führen würde (Weller et al. 1991). Für diese Arbeit wurde deswegen eine neue Gruppe von Fluoreszenzfarbstoffen benutzt, die als eine wesentliche Eigenschaft die Wasserlöslichkeit besitzen und dadurch auch in rein wässrigen Systemen eingesetzt werden können. Diese Farbstoffgruppe wird unter dem eingetragenen Warenzeichen Alexa® von der Firma Molecular Probes Inc., kommerziell vertrieben. Es sind Fluorophore mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen erhältlich, die Extinktionsmaxima sind entsprechend unterschiedlich (Abb. 8). Die Differenzen in den Extinktionsmaxima ermöglichen die gleichzeitige Verwendung von unterschiedlich Alexa®-Fluorophoren an verschiedenen Proteinen.

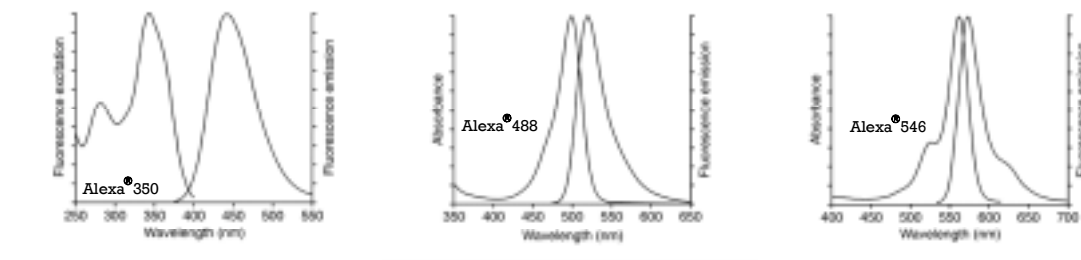


Abb. 8: Absorptions- und Emissionsspektren von Alexa®350, -488 und -546 an IgG, pH 7,2 – 8,0 entnommen den jeweiligen Produktinformation der Molecular Probes Inc.

Die Nomenklatur erfolgt nach der Extinktionswellenlänge, in der vorliegenden Arbeit wurden die Produkte Alexa®350 (blaue Fluoreszenz), Alexa®488 (grüne Fluoreszenz) und Alexa®546 (rote Fluoreszenz) verwendet. Die Formeln der Substanzen sind unten dargestellt (Abb. 9 - 11).

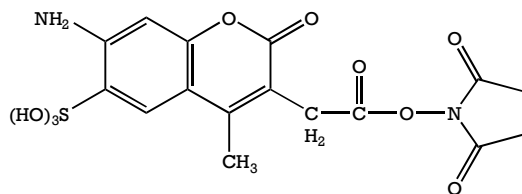


Abb. 9: Strukturformel Alexa®350, Molecular Probes Inc.

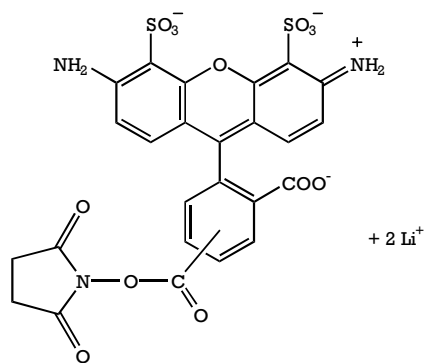


Abb. 10: Strukturformel Alexa®488, Molecular Probes Inc.

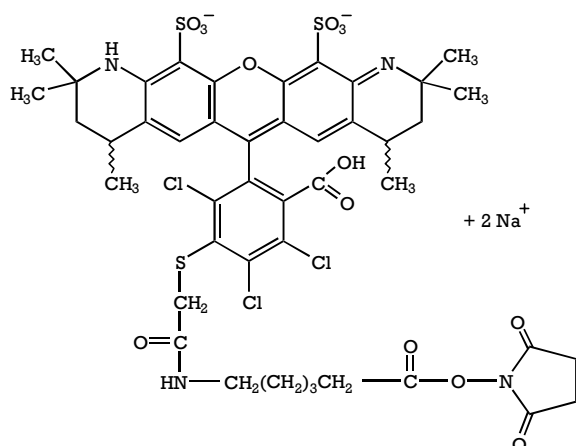


Abb. 11: Strukturformel Alexa®546, Molecular Probes Inc.

Alle drei genannten Fluoreszenzfarbstoffe tragen als chemisch reaktive Komponente eine Succinimidylestergruppe, die unter alkalischen Bedingungen mit primären Aminogruppen unter Bildung eines Amids reagiert. Der Reaktionsablauf ist in Abb. 12 schematisch dargestellt.

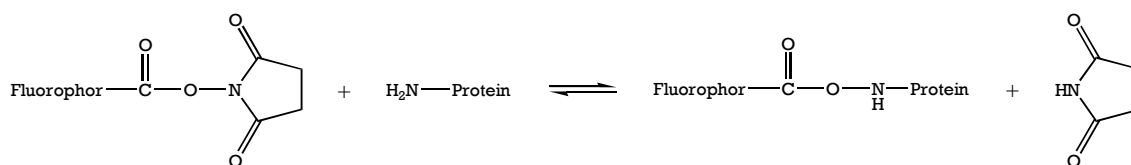


Abb. 12: Reaktionsschema von Succinimidylestern mit Aminogruppen

Die Farbstoffe werden kommerziell ausschließlich als fertiges Markierungs-Set angeboten, d.h. es sind bereits alle im wesentlichen benötigten Chemikalien und Materialien enthalten. Die Arbeitsvorschrift des Herstellers wurde leicht variiert (s.u.), um die Testung der fluoreszenzmarkierten Proteine im Zellkultursystem möglichst ohne Nebeneffekte sicherzustellen.

Prinzipiell wurden die Fluoreszenzmarkierungen nach dem folgenden Schema durchgeführt:

Das aufgereinigte zu markierende Protein wurde in einem Puffer ohne Ammonium-Ionen bzw. Amine (in der Regel in einem 0,1 bis 0,5 molarem Phosphatpuffer) in einer Konzentration von 1 bis 2 mg/ml dargestellt. Der im Set enthaltene Puffer ( $\text{NaHCO}_3$ , 1,0 mol/l in der Gebrauchslösung) wurde durch Zusatz von autoklaviertem destilliertem Wasser nach Herstellerangaben hergestellt, ebenso die Hydroxylamin-Lösung. Im Set ebenfalls enthalten sind Resin (in Natriumazid-



haltigen Phosphatpuffer) als feste Matrix der Einweg-Säulen (Länge 22 cm, Innendurchmesser 5 mm) und ein Elutionspuffer (10 fach Konzentrat,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,1 mol/l,  $\text{NaCl}$  1,5 mol/l,  $\text{NaN}_3$  2 mmol/l pH 7,2). Das Resin (Größenausschlusschromatographie) ist für die Trennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von mehr als 15 kD von freiem Fluorophor ausgelegt.

Da die Lagerbedingungen (- 20 °C) der fluoreszenzmarkierten Toxine und Fragmente einen Zusatz von Natriumazid nicht erforderlich machten und um negative Einflüsse des Azids in der Zellkultur auszuschließen, wurde ein Elutionspuffer ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  10 mmol/l,  $\text{NaCl}$  150 mmol/l, pH 7,2) hergestellt. Die gepackte Resinsäule wurde vor dem Auftragen des Reaktionsgemisches mit 30 ml dieses Puffers gespült.

Für die eigentliche Fluoreszenzmarkierung wurden 0,5 ml der auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml eingestellten Proteinlösung mit 100 µl der vorbereiteten Bicarbonatlösung versetzt, und diese Mischung in das Reaktionsgefäß mit dem jeweiligen Fluorophor gegeben. Das Gemisch wurde dann für 90 Minuten bei + 4 °C mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt (Rührfisch ist bereits im Reaktionsgefäß enthalten).

Nach Herstellerangaben soll die Reaktion in 60 Minuten bei Raumtemperatur erfolgen, die Markierung erfolgt jedoch auch unter den geänderten Bedingungen nachweisbar mit gutem Ergebnis. Versuche zur Fluoreszenzmarkierung bei geringer Temperatur waren durchgeführt worden, um lagerungs- bzw. temperaturbedingte Veränderungen der biologische Wirksamkeit von Toxinen und Fragmenten möglichst gering zu halten.

Parallel zur Markierungsreaktion wurde die Einwegsäule mit der Resinmatrix befüllt und mit dem o.g. Puffer äquillibriert. Nach 90 Minuten wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes auf die Säule gegeben und entsprechend mit Puffer eluiert. Es wurden jeweils zwei farbige Banden erkennbar, von denen die erste innerhalb von etwa 45 Minuten in Fraktionen zu ca. 1 ml gesammelt wurde. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE überprüft. Zu nächst wurden die Banden im UV - Licht auf eine Fluoreszenz, bei einer anschließenden CB - Färbung bezüglich des Molekulargewichtes im Vergleich zu einem Standard - Markergemisch überprüft.

Im Folgenden sind Ergebnisse einiger Markierungsansätze beispielhaft beschrieben, auf die detaillierte Darstellung aller Versuche und Kontrollen wurde verzichtet, da sich das Verfahren praktisch standardisiert angewendet wurde.

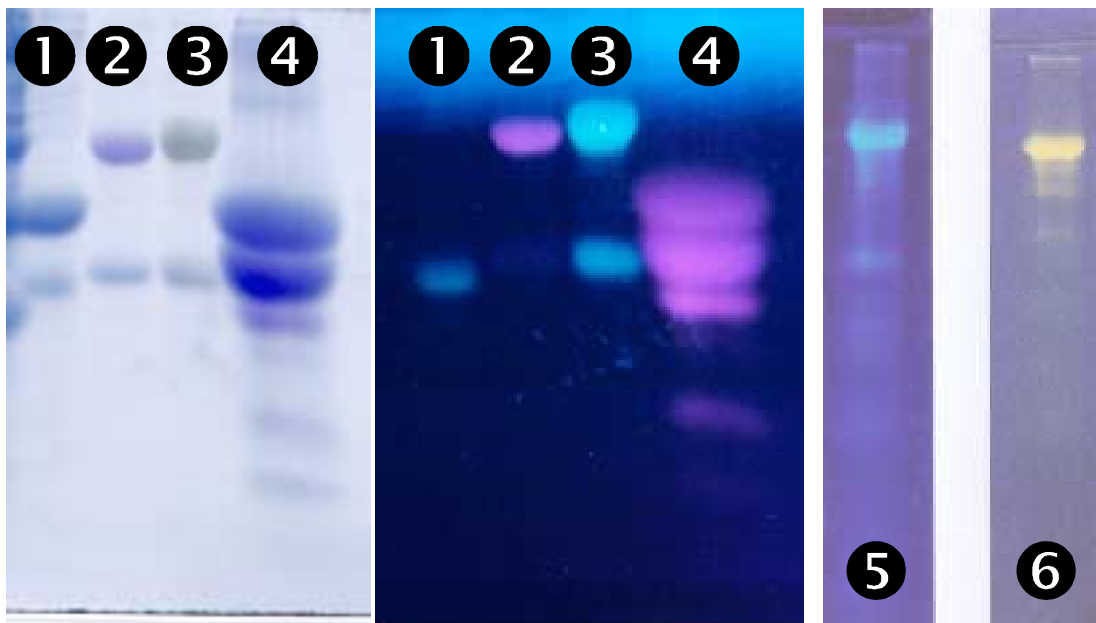


Abb. 13: SDS-PAGE (10 %, Probenpuffer mit Thioethanol) von folgenden Proteinkonjugaten:

- 1: H<sub>C</sub> (Fragment C) - FITC (List Labs, stabilisiert mit unmarkiertem BSA)
- 2: TeNT-Alexa@546
- 3: TeNT-Alexa@488
- 4: BSA-TRITC
- (1-4 links nach CB-Färbung, rechts ungefärbt unter UV-Licht bei 254 und 355 nm)
- 5: rec. TeNT („VQLIH“-Doppelmutante und His<sub>6</sub>-tag) markiert mit Alexa@350
- 6: rec. TeNT („VQLIH“-Doppelmutante und Strep-tag@II) markiert mit Alexa@546

Die ungefärbten Gele wurden unter UV-Licht (254 und 355 nm) kontrolliert und fotografiert, anschließend erfolgte eine Färbung mit Coomassie blue (Abb. 13).

Das wie oben beschrieben mit Alexa@488-markierte native TeNT wurde am isolierten Zwerchfell der Maus im Vergleich zum unmarkierten, nativen TeNT auf seine Neurotoxizität überprüft.

Bei der Testung am Zwerchfell wird einer getöteten Maus das Zwerchfell mit dem Nervus phrenicus entnommen. Der präparierte Muskel mit dem innervierenden Nerven wird in einem Organbad an einem Dehnungsmesser so befestigt, dass die Kontraktionsamplitude des Muskels bei elektrischer Stimulation des Nerven gemessen werden kann. Aus dem Vergleich der Amplituden-Zeit-Verläufe verschiedener Zwerchfellpräparate mit standardisierten Toxinzusätzen können

Rückschlüsse auf die Hemmung der Exozytose der eingesetzten Testsubstanz gezogen werden.

Das TeNT-Alexa®488 zeigte in diesem Versuch nur eine geringe Hemmung der Aktivität des Nervus phrenicus, im 3-Kammer-Zellkultursystem war – wie im Folgenden unter 4.1.2 beschrieben – Bindung an neuronale Zellen und Transport in motorischen SC-Neuronen nachweisbar.

## 2.6 Zellkultur

Um den Transport der Toxine und Fragmente unter möglichst physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, wurden für die vorliegende Arbeit primäre neuronale Zellkulturen angelegt. Dabei wurden zwei unterschiedliche neuronale Zellen, Hinterwurzelganglienzellen (Dorsal Root Ganglia Cells, DRG) und Rückenmarksneurone (Spinal Cord Cells, SC) aus Hühnerembryonen des 11.-13. embryonalen Entwicklungstages gewonnen.

Während es sich bei den DRG Neuronen um sensible, d.h. aus der Peripherie zum ZNS leitende Zellen handelt, sind die SC Neurone motorische, d.h. vom ZNS zur Muskulatur leitende Zellen (Abb. 14), sowie inhibitorische und exzitatorische Interneurone.

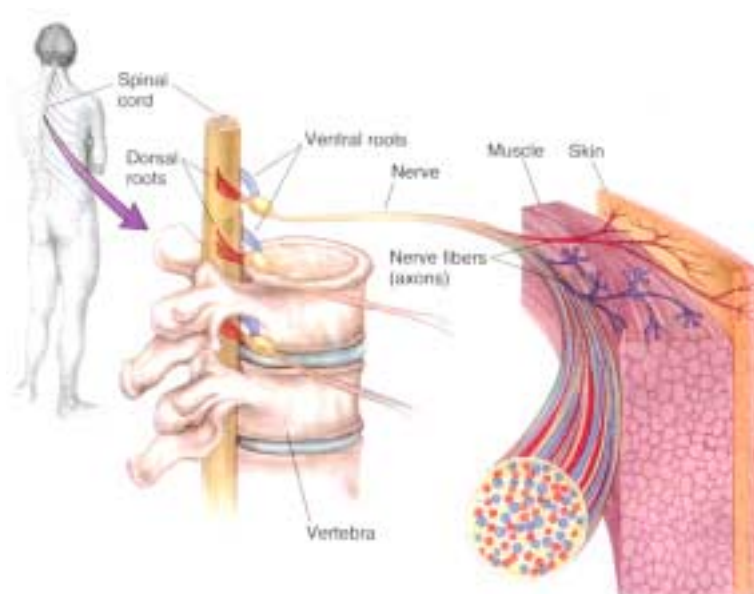


Abb. 14: Schematischer Verlauf der anterograden und retrograden neuronalen Leitungsbahnen beim Menschen (aus: Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (1996) Neuroscience)

Die Präparation der beiden Zelltypen erfolgte aus einem bebrüteten Hühnerei. Vor der Entnahme des Hühnerembryos wurde die Eierschale durch mehrfaches Besprühen mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Zur Präparation wurde das 11-13 Tage lang bei + 37 °C und wassergesättigter Luft bebrütete Hühnerei am abgerundeten Pol so geöffnet, dass der Hühnerembryo mit einer Pinzette erreicht werden konnte. Der Embryo wurde dann dem Ei entnommen und sofort durch Dekapitation getötet. Unter einem Biokular wurden unter sterilen Bedingungen dem

auf dem Rücken liegenden Embryo von ventral alle Brust- und Bauchorgane entnommen (Abb. 15).

Nach der Darstellung der Wirbelsäule und des großen Beckens wurden dann zunächst die Hinterwurzelganglien entnommen und in Dulbecco's Aufbewahrungslösung mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  zwischengelagert. Pro Embryo lassen sich i.d.R. bis zu 14 Ganglien, im Wesentlichen aus dem Bereich der Lendenwirbelsäule, präparieren.

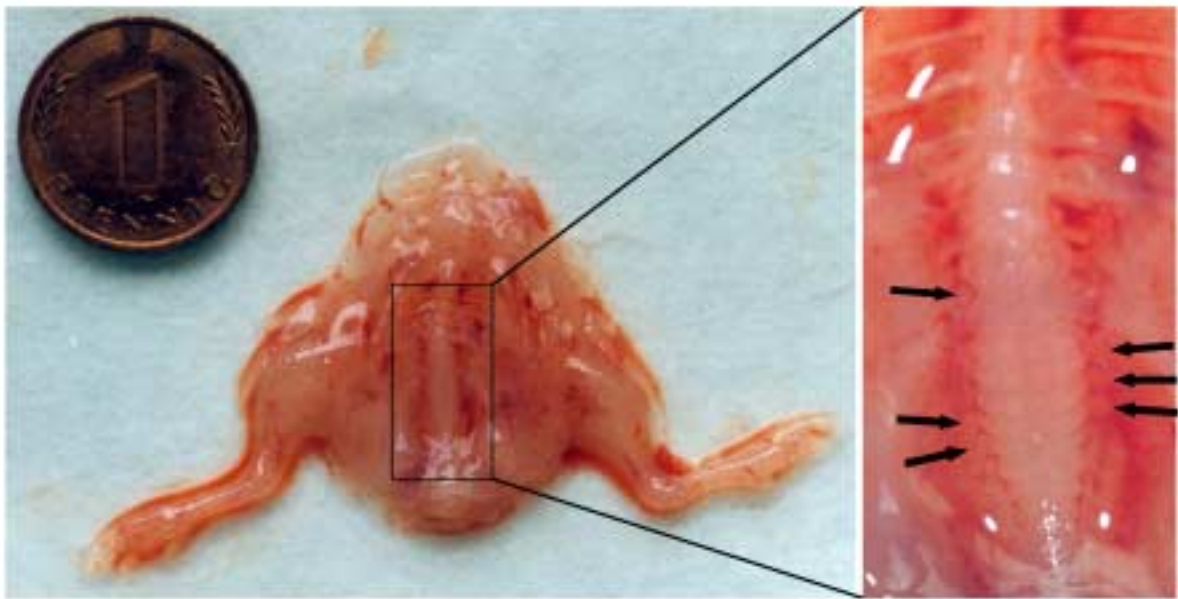


Abb. 15: 11 Tage alter Hühnerembryo von ventral nach Entnahme der Bauchorgane. Im rechten Bildausschnitt ist die Wirbelsäule mit den Hinterwurzel-Ganglien (helle, kugelige Strukturen beidseits der Wirbelkörper, Pfeile) vergrößert dargestellt. Die Münze dient als Größenvergleich.

Anschließend wurde der Wirbelkanal eröffnet. Dazu wurden die Wirbelkörper mit der Pinzette (No. 5, gewinkelt  $45^\circ$ ) an beiden Seiten durchtrennt und der so erhaltene Wirbelspan abgehoben. Das Rückenmark wurde in einem Stück entnommen und separat ebenfalls in Dulbecco's Aufbewahrungslösung (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gegeben. Unter dem Biokular wurde im Anschluss die Dura mater spinalis weitestgehend entfernt.

Die nachfolgende Dissoziation wurde für die DRG- und SC-Neurone separat, aber analog durchgeführt.

Hinterwurzelganglien bzw. Rückenmark wurden dazu mit einer Pinzette in jeweils ein 15 ml Zellkultur-Röhrchen überführt, in das 5 ml Dulbecco's Medium (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ), 0,5 ml Trypsin-Lösung (0,25 % in  $\text{H}_2\text{O}$ ) und 0,5 ml DNase-Lösung (2 mg/ml in Dulbecco's Medium ohne  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$ ) vorgelegt worden waren. Nach einer einfachen mechanischen Zerkleinerung des neuronalen Gewebes wurden die verschlossenen Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C 10 Minuten lang unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Röhrchen wurden danach für ca. 2 Minuten senkrecht gestellt, um ein Absetzen der Zellen zu ermöglichen.

Die in einigen Präparationsvorschriften angegebene Zentrifugation zur Sedimentation der Zellen wurde ebenfalls in verschiedenen Variationen ausprobiert, die Kulturergebnisse waren dabei jedoch erheblich schlechter als ohne Zentrifugation. Die Neuronen sind offenbar sehr empfindlich gegenüber den mechanischen Belastungen selbst bei verhältnismäßig niedrigen Zentrifugationsgeschwindigkeiten und Zentrifugationszeiten von 2 bis 5 Minuten.

Die über dem Zellpellet stehende Enzymlösung wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen. Danach wurde jeweils MEM 1 (niedrige NGF-Konzentration, 37 °C, 10 %  $\text{CO}_2$ -äquillibriert) zugegeben, und die Gewebefragmente wurden durch mehrfaches Aufziehen in einer Pasteurpipette dissoziiert. Die Lösung trübte dabei sichtbar ein, der Vorgang wurde jeweils so lange wiederholt, bis keine sichtbaren Gewebeteile mehr vorlagen. Das Volumen des zugegebenen Mediums wurde durch die Anzahl der präparierten Ganglien bzw. Rückenmarkstränge bestimmt: Es wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  pro Ganglion bzw. 2 ml pro Rückenmark zugegeben.

Im Rahmen der vorliegenden Versuche war auch versucht worden, eine definierte Zellzahl in dem Zellkultursystem einzusetzen. Die Zellzählungen in einer Zählkammer nach Neugebauer führten jedoch nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen, da vor allem die DRG-Zellen offenbar zu groß für die Zählkammer waren. Die empirisch gewonnen Verhältnisse führten dagegen zu guten Ergebnissen in der Kultur.

Die Suspension der dissoziierten Zellen wurde dann in die jeweiligen Kulturgefäße gegeben. Für Bindungsexperimente wurden 4fach Wells (15 mm i.Ø, Nunc)

genutzt, für die Transportuntersuchungen die mit den Tefloninserts entsprechend vorbereiteten Kulturschalen (35 mm i.Ø, Becton Dickinson). In die 4-fach Wells wurden dazu jeweils ca. 200 µl, in die Zentralkammer des 3-Kammer-Kultursystems ca. 100 µl der Zellsuspension gegeben. Nach 60 – 90 Minuten wurden die zellhaltigen Kompartimente jeweils mit Medium (4-fach Wells jeweils 300 µl, Zellkultursystem ca. 2 ml MEM 1) aufgefüllt, in dieser Inkubationszeit hatten sich die Neurone am Boden der Kulturschale absetzen können. Details zum 3-Kammer-System werden in dem entsprechenden Abschnitt beschrieben.

Die Kultur der Zellen erfolgte in sterilen Wärmeschränken bei 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage zu ca. 80 % gewechselt.

Bei der Kultur der SC-Neuronen wurden vom 3. bis 6. Tag FUDR und Uridin in erhöhter Konzentration (MEM 1FU) zugesetzt, um den Anteil der nicht-neuronalen Zellen durch Hemmung der Mitose zu reduzieren.

Die Zellen konnten i.d.R. nach 10- bis 15-tägiger Kulturzeit für Experimente genutzt werden. Unter den genannten Kulturbedingungen war eine Kultur für rund drei bis vier Wochen möglich, bevor erste Anzeichen von Apoptose zu beobachten waren. Um möglichst reproduzierbare Bedingungen zu erreichen, wurden die Zellen nicht mehr nach dem 21. Tag in der Kultur für Experimente benutzt.

Nach den jeweiligen Experimenten wurden die Tefloninserts entnommen und Kulturschalen mit Zellen und Medium nach dem Autoklavieren entsorgt.

Es wurden auch einige Versuche mit retinalen Ganglienzellen, ebenfalls vom embryonalen Hühnchen des 11. Entwicklungstages, durchgeführt. Dazu wurden dem getöteten Embryo die Augen entnommen und durch den Glaskörper die Retina mit zwei Pinzetten herauspräpariert (Watanabe und Fukuda 1997; Morino et al. 1996, Ho et al. 1997,). In etwas Dulbecco's Aufbewahrungslösung (mit Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Zusatz) wurden die groben Anhaftungen unter dem Biokular entfernt.

Es erwies sich als sehr schwierig, die Retina bzw. die retinalen Ganglienzellen in einem definierten Zustand in das 3-Kammer-Kultursystem zu überführen. Auch war durch praktisch unvermeidbaren Anhaftungen von gefärbten retinalen Zellen die

mikroskopische Beobachtung der Zellkultur nur sehr eingeschränkt möglich. Die Versuche wurden aus diesen Gründen nach einiger Zeit wieder eingestellt.



## 2.7 Das 3-Kompartiment-Zellkultursystem

Vorraussetzung für Untersuchungen zum Transport einer Substanz ist ein Testsystem mit mindestens zwei getrennten Kompartimenten.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Vorraussetzungen durch die Nutzung des 3-Kompartiment-Zellkultursystems geschaffen, das von Sonderegger und Campenot (Abb. 16) für Untersuchungen an neuronalen Wachstumsfaktoren und –bedingungen entwickelt worden ist (Campenot 1982a, b, 1987, 1994, Sonderegger et al. 1983, Stoeckli et al. 1989, 1996, Kuhn et al. 1991, Vance et al. 1991, Savoca et al. 1995, Senger und Campenot 1997, Kimpinski et al. 1997, de Chaves et al. 1997, Ure und Campenot 1997).

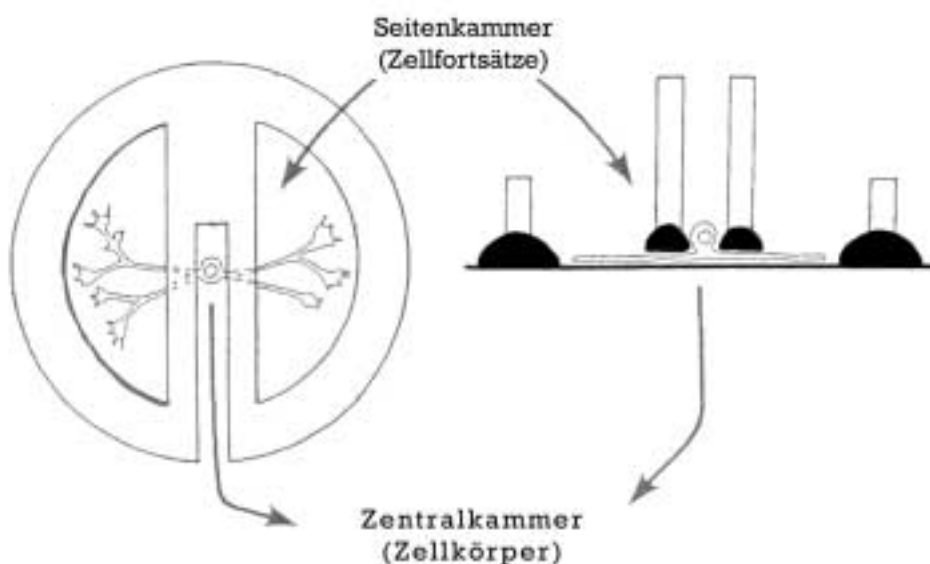


Abb. 16: Schnittbild durch das Zellkultursystem

Das System besteht im wesentlichen aus einer 35 mm Zellkulturschale und einem Tefloninsert. Das Tefloninsert wurde in der Forschungswerkstatt der MHH in angefertigt. Im Verlauf der Experimente wurden verschiedene Modifikationen des Zellkultursystems und Varianten des Inserts ausprobiert, es konnten so einige Vereinfachungen in der Arbeit mit dem System erreicht werden.

Die Kulturschalen wurden zunächst kollagenisiert. Mit einem selbstgebauten "Kamm" aus mehreren aneinandergereihten und zusammengeklebten Stecknadeln (s. Abb. 17) wurden nach dem Trocknen der Kollagenschicht parallele Kratzer in die Schicht und auch in das Material der Kulturschale gemacht. Die Kratzer dienten im weiteren Verlauf den wachsenden Fortsätzen der Neuronen als Leitstruktur, sie

wurden dazu im Abstand von ca. 0,5 bis 1 mm und einer Länge von ca. 1 cm in die Mitte der Kulturschale gelegt. In den zentralen Bereich der Kratzer wurde dann jeweils ein ca. 4 mal 5 mm großer Tropfen einer 1,25 %igen Methylcellulose-Lösung aufgebracht. (2,5 %ige Methylcellulose-Lösung in Aqua dest., autoklaviert, und Ham's F 12 Medium, Gibco, zu gleichen Teilen

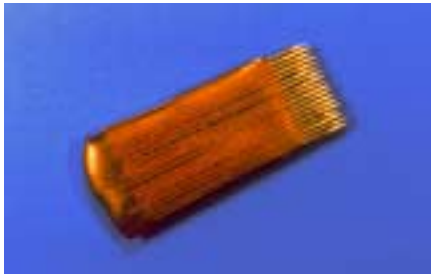


Abb. 17: Nadelkamm zum Ankratzen der kollagenisierten Zellkulturschalen

Die Methylcellulose-Lösung dient den wachsenden neuronalen Fortsätzen als Matrix zwischen Kollagen einerseits und siliconefettetem Tefloninsert andererseits. Die verhältnismäßig niedrige Viskosität und die geringe Dicke der Methylcellulose-Schicht nach dem Einbringen des Inserts andererseits stellen dabei eine ausreichende Diffusionsbarriere dar.

Die autoklavierten Tefloninserts wurden zunächst mit der Unterseite in ebenfalls autoklaviertes Siliconfett (High Vacuum Grease, Dow Corning) aufgesetzt. Durch leichtes Verkanten und Bewegen wurde eine vollständige und ausreichende Benetzung der Insert-Unterseite sichergestellt. Die Inserts wurden dann wieder vom Siliconfett abgehoben, in der dargestellten Ausrichtung (Abb. 18) senkrecht zu den Kratzern in die Kulturschale eingesetzt und mit leichtem Druck fixiert. Das an der Unterseite der Inserts verbliebende Siliconfett wirkt hier als Klebe- und Abdichtsubstanz.

Um die Dichtigkeit des Systems zu überprüfen, wurden verschiedene Tests durchgeführt. Nach dem Einkleben des Inserts wurden die beiden Seitenkammern mit 200 µl MEM 2 (hohe NGF-Konzentration) gefüllt. Die so präparierten Kämmerchen wurden i.d.R. über Nacht mit dem Medium nur in den Seitenkammern im Wärmeschrank unter den Kulturbedingungen inkubiert, um individuell die Dichtigkeit zu belegen. Etwa 20 bis 30 % der so bestückten Kulturschalen erwiesen sich als undicht und wurden nicht mit Zellen "beladen".

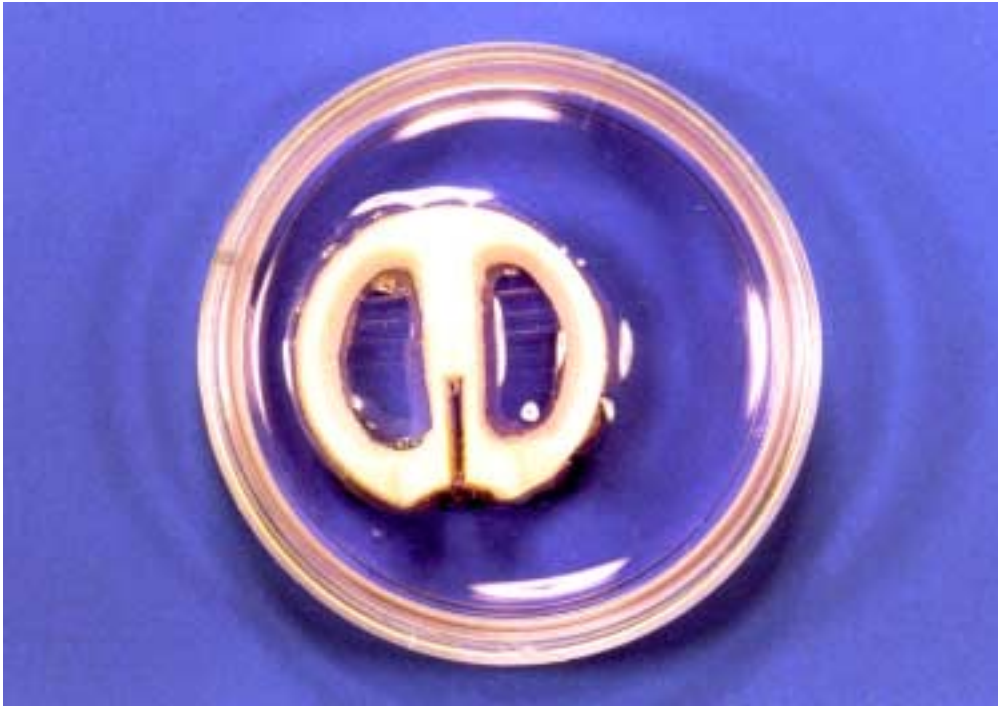


Abb. 18: Darstellung des 3-Kompartimentsystems

Um die tatsächliche Diffusionsdichtigkeit einer in oben beschriebener Weise als dicht identifizierten Kammer zu belegen, wurden Diffusionskontrollen mit radioaktiv markiertem BSA und verschiedenen fluoreszenzmarkierten Proteinen angestellt. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass keine Diffusion aus den als "dicht" identifizierten Seitenkammern in das mittlere Kompartiment hinein erfolgt. Auch eine entsprechende Konvektion (gegenüber der mittleren Kammer deutlich erhöhter Mediumspiegel in den Seitenkammern) konnte ausgeschlossen werden. Die Messungen der Radioaktivität von  $I^{125}$ -markiertem BSA ergab im Medium im zentralen Kompartiment auch zwei Stunden nach Zugabe des markierten BSA in die Seitenkompartimente keine Zunahme der Aktivität gegenüber der Ausgangslösung.

Bei Experimenten mit fluoreszenzmarkiertem TeNT in "undichten" und "dichten" Kammern konnte gezeigt werden, dass Undichtigkeiten im System unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Zugabe von markiertem Protein innerhalb von wenigen Minuten erkennbar werden (Abb. 19 und 20).



Abb. 19: Zellkultursystem, dichte Zentralkammer, Vergrößerung 80-fach, 60 Minuten nach Zugabe von fluoreszenzmarkiertem TeNT (TeNT-A488). Rechts und links ist Fluoreszenz in den Seitenkammern sichtbar. In der Zentralkammer ist keine Fluoreszenz erkennbar.

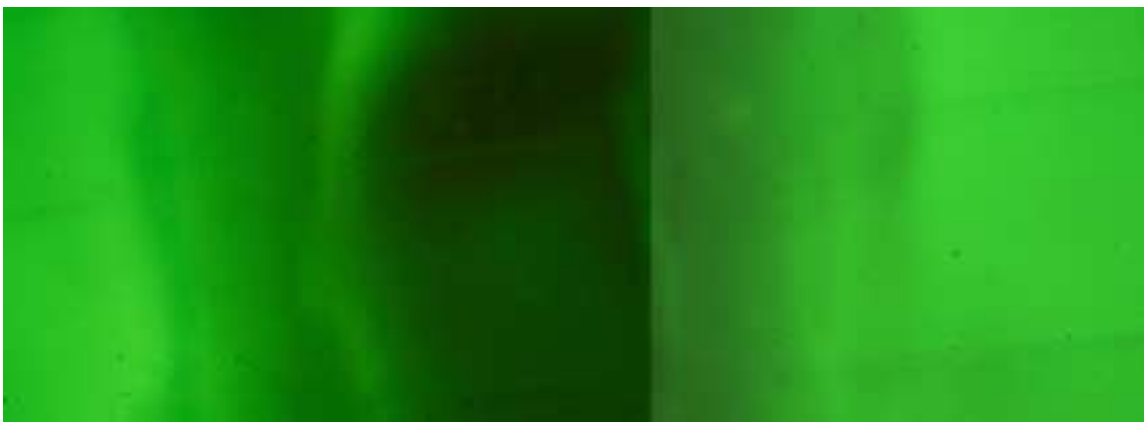


Abb. 20: Zellkultursystem, undichte Zentralkammer, Vergrößerung 80-fach, 2 Minuten nach Zugabe von fluoreszenzmarkiertem TeNT. Rechts und links ist Fluoreszenz in den Seitenkammern sichtbar. In der Zentralkammer ist auch ein deutlich fluoreszierender, von links kommender, Saum erkennbar.

Diese Experimente bestätigen frühere Ergebnisse von Campenot und Sonderegger (Campenot 1982a, b; Sonderegger et al. 1983), die eine wirksame Konvektions- und Diffusionsbehinderung zwischen den Kompartimenten dieses Zellkultursystems beschrieben haben.

In Abbildung 21 ist eine 3-Kammer-Kultur von DRG-Zellen in der Übersicht zu sehen.

Da gerade zu Beginn der Versuche mit dem Zellkultursystem häufiger Undichtigkeiten auftraten, wurde in verschiedenen Versuchsreihen versucht, eine Optimierung bzw. Vereinfachung des Kultursystems zu erreichen.

In einer Versuchreihe wurden Kammern mit abweichenden Grundrissen getestet (Abb. 22).



Abb. 21: DRG-Neurone im 3-Kammer-Kultursystem (200x, Phasenkontrast)

In der Bildmitte die Zellkörper von DRG-Neuronen (13. Tag in der Kultur) im zentralen Kompartiment (Z), beidseits begrenzt durch das Tefloninsert (senkrechte dunkle Balken, T) mit sichtbar unter der Teflon hervorquellendem Silikonfett an den Seiten. Die Zellfortsätze sind erkennbar als dünne Strukturen (Pfeile) in den Seitenkammern (S), gewachsen vom zentralen Kompartiment, unter den Barrieren beidseits hindurch, in das linke und rechte Seitenkompartiment hinein.

Die Kratzer in Kollagenbeschichtung und in Kulturschalenboden sind als breitere, z. T. verzweigt erscheinende Struktur mit etwa waagerechtem Verlauf erkennbar.

Das Wachstum der Zellfortsätze erfolgt parallel, in der Regel jedoch - wie hier zu erkennen - in einer gewissen Abstand zu den gekratzten Rillen.

Die Abbildung wurde aus 6 Einzelaufnahmen zusammengesetzt, durch die erforderlichen Unterschiede in den jeweiligen Belichtungszeiten erscheinen die Übergänge zwischen den Einzelaufnahmen als Sprung in der Helligkeit.

Um mehrere unabhängige Versuche in einer Kulturschale durchführen zu können, wurden kleine, zweizellige Kämmerchen mit unterschiedlich großen Kammerbereichen angefertigt (3 a und b). Mit diesen Kämmerchen konnten ebenfalls erfolgreich Neuronen kultiviert werden. Die Undichtigkeitsrate war jedoch gegenüber den dreizelligen Modell erhöht, da vermutlich die Haftung aufgrund der geringeren Bodenfläche nicht ausreichend groß war. Da sich das dreizelligen Modell bei Undichtigkeit einer Seite immer noch auf der anderen Seite nutzen lies, wurde überwiegend das dreizellige Modell verwendet.

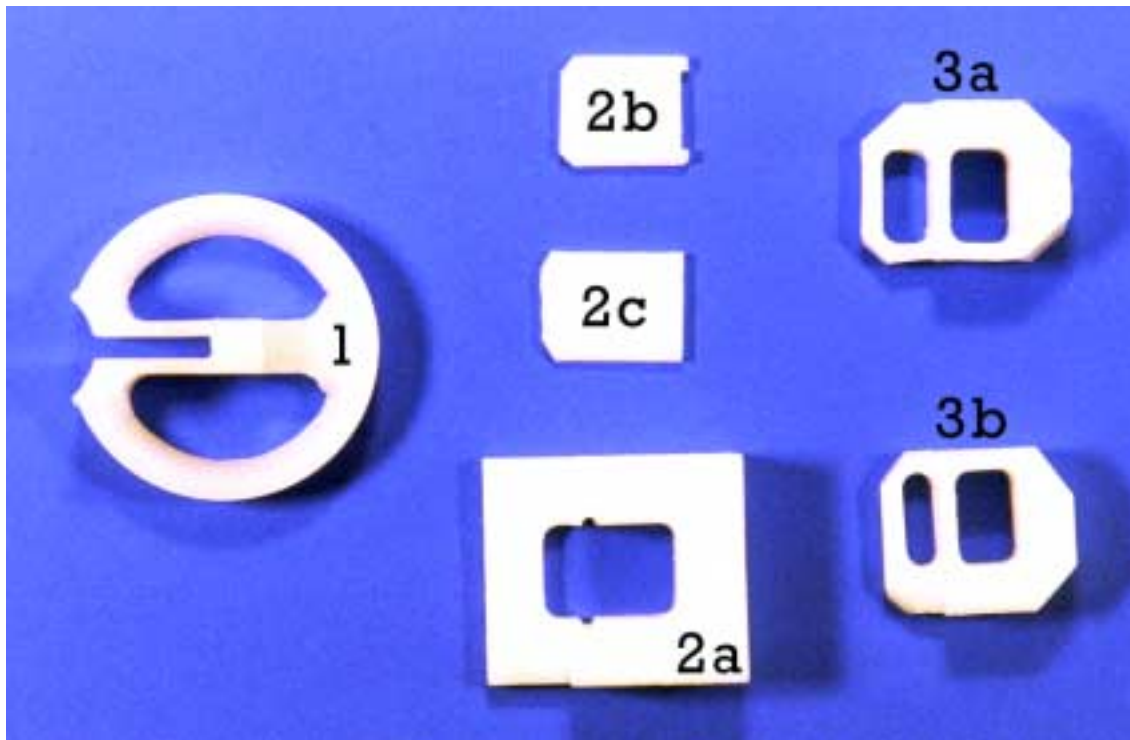


Abb. 22: Zellkultursystem, Tefloninserts mit verschiedenen Grundrissen

Links: 3-Kammer-Standardmodell nach Sonderegger und Campenot

Mitte: 2-Kammer-Modell mit herausnehmbarer Zentralbarriere (unterschiedliche Form)

Rechts: 2-Kammer-Modell mit fester Zentralbarriere (unterschiedlich große Fläche der Kammer für die Zellkörper)

Da zu Beginn der Arbeit die Erfolgsrate beim Wachstum der Zellfortsätze unter der gefetteten Barriere durch in das zweite Kompartiment hinein nicht groß war, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Einsatz von Fibrinkleber (Tissucol®, Immuno) als Dichtmittel getestet.

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Fortsätze ohne einschränkende Barriere bei entsprechendem Medien-Zusatz von NGF bereits nach wenigen Tagen eine Länge von mehreren Millimetern erreicht hatten, und diese Länge für eine Trennung mit einer ca. 1 mm dicken Barriere aus Teflon ausreichen würde, wurde der Ablauf der Kultur umgekehrt: Zunächst wurden die Zell-Suspension in die

kollagenisierten Kulturschalen gegeben, zu nach einigen Tagen wurden die Kämmerchen auf die differenzierten und gewachsenen neuronalen Kulturen gesetzt. Um einen gleichmäßigen Zellrasen zu erhalten, musste der gesamte Boden der Kulturschale mit Zellsuspension bedeckt werden, dieses erhöhte den Zellverbrauch jedoch um ein Vielfaches. Um den Zellbedarf zu reduzieren, wurde eine zweiteilige Kammer (Abb. 22: 2a - c) angefertigt, von der zunächst der äußere Teil (2a) mit Silikonfett auf den kollagenisierten Boden der Kulturschale geklebt wurde. Dann wurde die Zellsuspension eingefüllt. Erst nach 7 bis 12 Tagen wurde dann die 1 mm dicke Barriere (2c) in die Nuten des äußeren Teiles eingesetzt und bis auf den Boden abgesenkt. Die Barriere war vor dem Einsetzen ebenfalls an den Seiten (zur Führung in den Nuten) und auf der Unterseite (Kontakt mit dem Kulturschalenboden bzw. den inzwischen gewachsenen Zellfortsätzen) mit Silikon eingefettet worden.

Da bei dieser mechanischen Manipulation im System sehr leicht die Zellfortsätze geschädigt wurden und in den Folgetagen oft eine Degeneration der Zellfortsätze mikroskopisch zu beobachten war, wurde die Barriere an der Unterseite mit einer zentralen Aussparung von ca. 1 mm Höhe versehen, so dass der mechanische Druck durch die stehengebliebenen Seiten (vgl. Abb. 22: 2b, Aussparung auf der rechten Seite der abgebildeten Barriere) automatisch begrenzt wurde. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass die Zellen nach dem Einsetzen dieser Barriere eine höhere Überlebensrate hatten. Der in diesem Fall zunächst verhältnismäßig große Spalt konnte jedoch auch durch eine erhöhte Menge an Silikonfett nicht mit gutem Erfolg abgedichtet werden, so dass weiterführende Versuche mit Fibrinkleber als Abdichtmasse unternommen wurden.

Die Abdichteigenschaften des Fibrinklebers und die Dichtigkeit in dem hier interessierenden Zeitraum einer Kultur über maximal drei Wochen wurden in verschiedenen Versuchsreihen getestet. Der Kleber lässt sich – nach einiger Übung und nach dem Absaugen des Mediums bis auf einen dünnen Flüssigkeitsfilms über den Zellen – gut verarbeiten. Die Zellen tolerieren das biologische Material sehr gut und zeigen keine Degeneration. Wurde bei einer Kultur im ersten Versuch keine vollständige Abdichtung erreicht, lässt sich die Abdichtung praktisch beliebig oft unter den o.g. Voraussetzungen wiederholen. Die Dichtigkeit bleibt auch über



einen Zeitraum von knapp vier Wochen bestehen. Als sehr nachteilig - und letztlich Ausschlusskriterium - ist jedoch die Bildung von Fibrinfäden-Aggregaten in einer mehrere Millimeter breiten Zone um die Barriere herum, die ein Mikroskopieren der Zellen häufig unmöglich macht.

Da die genannten Versuche keine deutliche Steigerung der Rate der dichten 3-Kammer-Zellkultur-Systeme oder eine Verbesserung des Wachstums zur Folge hatte, wurden Versuche zur Optimierung des Systems eingestellt. Die Zusammensetzung und die Kombination der Zellkulturmedien wurde jedoch zur o.g. Zusammenstellung im Vergleich zu den Literaturangaben optimiert.

Um die Schädigung der DRG-Neuronen im Rahmen der Präparation möglichst gering zu halten, wurden auch Versuche mit ganzen Ganglien im 3-Kammer-Kultursystem gemacht. Die Präparation der Ganglien erfolgte wie beschrieben, die mechanische und auch die enzymatische Dissoziation in Einzelzellen wurde nicht durchgeführt. Es wurden pro Kammer ein bis zwei ganze Ganglien in die Zentralkammer eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte mit den gleichen Medien und unter den gleichen Bedingungen wie die der Einzelzellen.

Die Zellen zeigten auch unter diesen Bedingungen eine Differenzierung und ein Wachstum der Zellfortsätze.

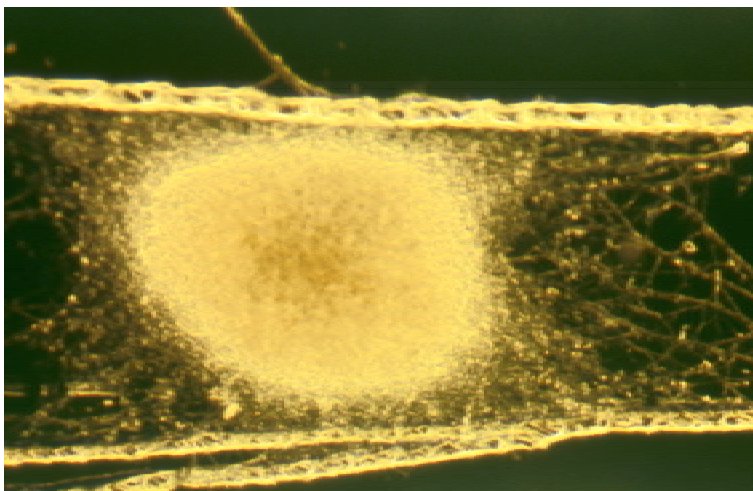


Abb. 23: Mikroskopische Aufnahme eines ganzen Hinterwurzel-Ganglions im Zellkultursystem

Wie in Abb. 23 zu erkennen ist, überqueren die Fortsätze auch in diesem Fall nicht die Rillen, die durch das Kratzen mit dem Nadel-Kamm in die Kollagenbeschichtung und den Boden der Kulturschale eingebracht worden sind. Etwa ab dem siebten Tag in der Kultur zeigen sich jedoch verstärkt degenerative Veränderungen an den



Ganglien in Form von offenbar absterbenden Zellen und Zellfortsätzen. Diese Veränderungen sind bei den dissoziierten Kontrollzellen nicht zu beobachten. (Die Veränderungen entsprechen denen, die beim langsamen Absterben der dissoziierten Zellen nach vier- bis fünfwöchiger Kultur zu beobachten sind.) Da die Kultur der dissoziierten Zellen nach der Modifikation der Präparationsvorschrift als gut reproduzierbar und verhältnismäßig stabil erwies, wurde auf Versuche zur weiterführenden Optimierung der Kultur nicht-dissoziierter Ganglien verzichtet. Vermutlich traten in diesen Kulturen eine latente Mangelversorgung bei nicht außenliegenden Zellen im Ganglion auf, die zum Untergang der betroffenen Zellen führte.

### 3. Experimente

Wie eingangs beschrieben, erfolgt die Wirkung des TeNT in fünf Schritten: Bindung, rezeptorvermittelte Endozytose, Translokation, Aktivierung und Proteolyse. Das 3-Kompartiment-Modell eignet sich für Experimente zur Unterscheidung von Bindung und Transport. Die Bindung der Testsubstanz an neuronale Zellen wird zunächst in einer nicht-kompartimentierten neuronalen Zellkultur experimentell überprüft. Nur bei nachgewiesener Bindung an den entsprechenden Zelltyp (es wurden in die vorliegende Arbeit DRG und SC Neurone verwendet) wurde auch der intrazelluläre Transport im 3-Kompartiment-Modell überprüft.

#### 3.1 Bindungsexperimente

Für die Bindungsexperimente wurden Zellkulturplatten mit 4 Kavitäten, wie unter 2.6 beschrieben, kollagenisiert und mit der entsprechenden Zellsuspension von DRG oder SC Neuronen befüllt. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage zu ca. 80 % gewechselt. Bei den SC – Kulturen wurde beim ersten Medienwechsel ein Medium mit einem höheren FUDR und Uridin – Konzentration (MEM 1FU) eingesetzt, im weiteren Verlauf wieder das Standardmedium (MEM 1).

Bereits nach 5 bis 7 Tagen konnten die Kulturen zu den Bindungsexperimenten genutzt werden, es war zu diesem Zeitpunkt gutes Zellwachstum mit deutlich differenzierten Fortsätzen zu erkennen.

Direkt vor dem jeweiligen Experiment wurde das Medium vollständig entfernt, und je Kavität 100 µl frisches MEM 1 zugegeben, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

Für die Experimente wurden die verschiedenen Toxine bzw. Fragment direkt in die einzelnen Kavitäten pipettiert. Das Volumen betrug dabei je nach Proteinkonzentration 2 – 10 µl. Die Zellen wurden mit den markierten Proteinen unterschiedliche Zeit inkubiert. Der positive Nachweis einer Bindung erfolgte i.d.R. innerhalb von wenigen Minuten. Um Bindungsexperimente abschließend als negativ zu beurteilen, wurden die Zellen bei Wiederholungsexperimenten auch deutlich länger inkubiert. Die entsprechenden Inkubationszeiten sind unter den jeweiligen Ergebnissen angegeben.

### 3.2 Transportexperimente

Die Transportexperimente wurden mit dem vorbereiteten 3-Kompartiment-System (siehe 2.7) durchgeführt. Der anterograder Transport von Proteinen und anderen Verbindungen (d.h. vom Zellsoma in die Peripherie) entspricht physiologischen Vorgängen in der Zelle. Die in Nähe des Zellkernes synthetisierten Verbindungen, z.B. Rezeptoren, Signalproteine, werden über intrazelluläre Transportmechanismen in die Peripherie transportiert. Der Nachweis des intrazellulären Transportes von markiertem Toxin, das im Bereich des Zellfortsatzes angeboten worden ist, deutet also einen analogen Transport in retrograder Richtung. Durch retrograden Transport gelangt - wie eingangs dargestellt - das Tetanustoxin nach einer Wundinfektion aus der Peripherie in das Rückenmark.

Nach einer Wachstumszeit von 10 bis 14 Tagen mit den entsprechenden Medienwechseln wurden das Medium der zentralen Kammer (Mediumreservoir ist dabei der gesamte Raum der Kulturschale mit Ausnahme der Seitenkammern) direkt vor dem Experiment vollständig durch 1 ml MEM 1 ersetzt. Das Medium in den Seitenkammern wurde ebenfalls vollständig entfernt und durch 100 µl MEM 2 ersetzt. Durch diese Verfahrensweise sollten einerseits möglichst reproduzierbare Bedingungen hergestellt werden, andererseits wurden durch die zugegebenen Volumina unterschiedliche Medien-Spiegel in den beiden Kompartimenten eingestellt. Der Medium-Spiegel in den Seitenkammern war dabei niedriger als in der Zentralkammer. Bei minimalen Undichtigkeiten der Kammern wurde so die Konvektion von markierter Testsubstanz in die Zentrale Kammer unterdrückt. Bei größeren Undichtigkeiten (die aber auch gerade bei der Arbeit mit fluoreszenzmarkierten Substanzen unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennbar sind) fällt der Niveau-Ausgleich der Mediumspiegel in Seiten- und Zentralkammer auf.

Für die Experimente wurden die verschiedenen Toxine bzw. Fragmente direkt in die Seitenkammern pipettiert. Das Volumen betrug dabei je nach Proteinkonzentration 2 – 10 µl. Die Zellen wurden mit den markierten Proteinen unterschiedliche Zeiten inkubiert. Der positive Nachweis des Transportes erfolgte i.d.R. innerhalb von 30 Minuten. Die entsprechenden Inkubationszeiten sind bei den jeweiligen Ergebnissen angegeben.

In anderen Versuchsreihen wurden die Zellen nach einem Medienwechsel (wie oben beschrieben) zunächst für ca. 5 Minuten bei + 4 °C gelagert, danach wurde das entsprechende Fragment oder Toxin zugesetzt und die Zellen erneut für einige Minuten bei + 4 °C inkubiert. Das Fragment bzw. Toxin wurde dann wieder entfernt und die Zellen nun bei 37 °C für wenige Minuten inkubiert. Diese Versuche sollten dazu dienen, die Geschwindigkeit des Transportes erkennbar und ggf. sogar quantifizierbar zu machen.

## 4. Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Bindungs- und Transportexperimente, geordnet nach den einzelnen Toxinen bzw. Fragmenten, aufgeführt. Die Nomenklatur entspricht der Tabelle 1.

Alle experimentellen Befunde wurden durch Parallel- bzw. Wiederholungsversuche bestätigt.

Die Dichtigkeit des Kammersystems wurde – wie unter 2.7 beschrieben – sowohl bei der Vorbereitung der Kulturschale als auch während des eigentlichen Experimentes überprüft. Positiv- bzw. Negativkontrollen mit TeNT-Alexa@488 bzw. BSA-TRITC oder reinem GFP wurden bei allen Versuchsreihen mitgeführt, werden aber nur einmal dargestellt.

Negativbefunde (= keine Bindung, kein Transport) wurden nur dokumentiert, sind aber i.d.R. nicht fotografisch dargestellt, da diese Befunde immer zweifelsfrei waren, und sich durch das vollständige Fehlen von Fluoreszenz unter entsprechender Fluoreszenzbeleuchtung darstellten.

### 4.1. Natives Tetanustoxin und Fragmente

#### 4.1.1 TeNT-I<sup>125</sup>

I<sup>125</sup>-markiertes TeNT bindet an DRG- und SC-Zellen, wird aber nur von SC-Zellen transportiert.

Die Abbildung 24 zeigt eine mikroskopische Aufnahme der Autoradiographie einer SC – Zellkultur im Kammersystem. Die Fixierung der Zellen vor der Autoradiographie wurde der Tefloneinsatz entfernt. Die linke Seite der Abbildung zeigt den Bereich der Zentralkammer mit den Zellkörpern der SC-Neurone, die Zellfortsätze im mittleren bzw. rechten oberen Bereich der Abbildung befanden sich unter dem (entfernten) Tefloneinsatz. Eine Aufnahme desselben Bildausschnittes im nativen Zustand zum Vergleich und zur Darstellung der genauen Position der Kammer war nicht möglich. Die Position des Tefloneinsatzes lies sich makroskopisch und mikroskopisch auch nach dem Entfernen durch die Anhaftungen des verwendeten Silikonfettes eindeutig bestimmen.

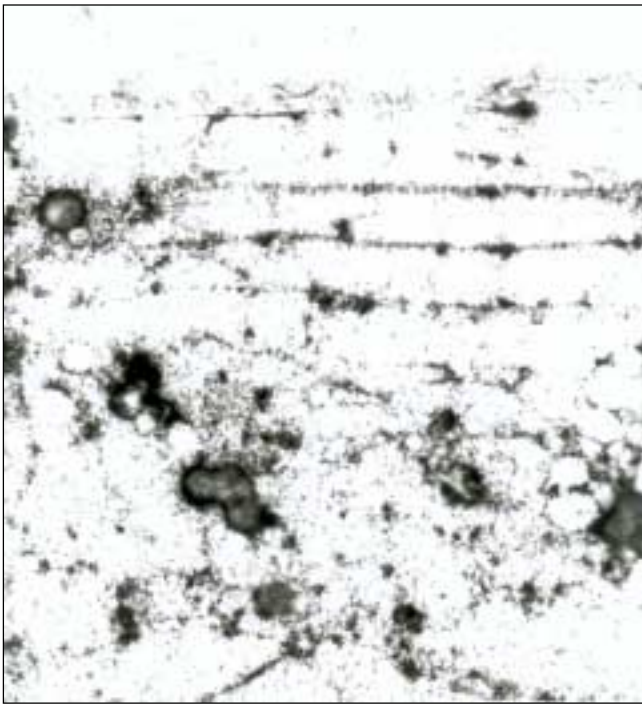


Abb. 24: Mikroskopische Aufnahme einer Autoradiographie von fixierten SC – Zellen nach Inkubation mit TeNT-I<sup>125</sup>. An Axonen und Zellkörpern lassen sich die Silberpartikel als Schwärzung erkennen, die durch die Einwirkung der radioaktiven Strahlung des I<sup>125</sup> nach der Entwicklung der Fotoemulsion (K.2, Ilford) aufgetreten sind.

Während die Markierung des Toxins mit dem o.g. Standardverfahren unter den üblichen Sicherheitsvorkehrungen beim Arbeiten mit radiokativem Iod<sup>125</sup> ohne Verfahrensprobleme möglich war, erwiesen sich die Bindungs- und Transportexperimente als schwer umsetzbar. Bei der Versuchsplanung waren als wesentliche Anforderungen an das in vitro – Testsystem vor allem die hohe Empfindlichkeit des Nachweises transportierter Moleküle bei gleichzeitig möglichst unbeeinflussten Moleküleigenschaften formuliert worden. Die deswegen gewählte radioaktive Markierung mit Iod<sup>125</sup> erfüllte diese Kriterien und es existierten bereits gute Erfahrungen mit konkret ausgewählten Markierungsverfahren (Erdmann, G. und Habermann, E. 1977).

Im Verlauf der Experimente traten jedoch an verschiedenen Stellen Probleme auf, die auf den besonderen praktisch-experimentellen Voraussetzungen des 3-Kammer-Kultursystems beruhen. Die Autoradiographie konnte nicht mit dem kompletten System mit eingesetztem Tefloninsert durchgeführt werden, da die Foto-Emulsion (K.2, Ilford) nicht unter das Tefloninsert zu den gewachsenen Axonen vordringen konnte. Um den Verlauf der Markierungen, d.h. den Verlauf der markierten Axone von der Seitenkammer in die Zentralkammer zum Zellsomata

und damit den Weg des transportierten Toxins verfolgen zu können, mussten die Tefloninserts vor der Autoradiographie entfernt werden. Die Inserts waren jedoch relativ fest mit dem kollagenisierten Boden der Kulturschalen mit dem Silikonfett verklebt, so dass selbst beim vorsichtigen manuellen Herausheben Teile der Kollagenschicht ebenfalls mit herausgehoben wurden, und so häufig viele Zellen entfernt wurden. Die Ansätze waren in diesem Fall nicht mehr auswertbar. Da die Zell-Fixierungslösung die Axone unter dem Insert nicht erreichen konnte, wurden sehr häufig auch lediglich die unfixierten Axone herausgelöst, was diese Ansätze ebenfalls unauswertbar machte. Variationen der Fixierungstechnik (vor und/oder nach dem Herausheben des Insert, andere Fixierungslösungen) brachten keine Verbesserung der Auswertbarkeitsquote.

Die Autoradiographie hatte auch noch weitere Nachteile: Die Zellen können nur im fixierten Zustand mit der Foto-Emulsion überschichtet werden, die Entwicklung der Autoradiographie dauert insgesamt rund 14 Tage, der Hintergrund (Artefakte durch natürliche Hintergrundstrahlung) ist verhältnismäßig groß.

Die Technik der radioaktiven Markierung ist ebenfalls mit hohen Kosten, sicherheitstechnischen Auflagen und gesundheitlichen Risiken behaftet. Die Halbwertszeit des verwendeten Iod<sup>125</sup> liegt bei 6 Wochen, das Iodierungsreagenz steht also nur eingeschränkt zur Verfügung.

Als wesentliches Ergebnis der Experimente mit radioaktiv markiertem Toxin lässt sich zusammenfassen, dass der Nachweis des Transportes zwar sicher möglich war, sich der experimentelle Aufwand bei eingeschränkter Auswertbarkeit jedoch als sehr groß darstellte. Der Einbau radioaktiver Isotope im Rahmen einer rekombinanten Herstellung der Toxine bzw. Fragmente ist zwar auf dem gleichen Wege wie bei den nativen Proteinen möglich, aber mit den gleichen Nachteilen behaftet.

Um die genannten Nachteile der radioaktiven Markierung zu vermeiden, wurde bei den folgenden Experimenten versucht, mit Fluoreszenzmarkierungen versehene Toxine und Fragmente zu nutzen. Die verwendeten Markierungstechniken wurden

bereits unter 2.4 (molekularbiologische Markierung) und unter 2.5 (chemische Fluoreszenzmarkierung) beschrieben.

#### 4.1.2 TeNT-Alexa®488 (-546, -350) und Hc-FITC

Natives TeNT bindet nach der Fluoreszenzmarkierung mit Alexa®488 (auch Alexa®546, -350) an DRG- und SC-Neurone.

Natives TeNT wurde nach der Fluoreszenzmarkierung zunächst wie unter 3.1 beschrieben DRG- und SC-Zell-Kulturen zugesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzmarkierung die Bindung des Toxins an die neuronalen Zellen nicht verhindert (TeNT-Alexa®488, Abb. 25). Diese Beobachtung war eine wesentliche Voraussetzung für die weiteren Versuche mit fluoreszenzmarkierten Toxinen und Fragmenten. Eine weitere wesentliche Beobachtung war der positive Nachweis des intrazellulären Transportes von fluoreszenzmarkiertem Toxin bzw. Fragment (TeNT-Alexa®546 bzw. Hc-FITC, Abb. 29 und 30).

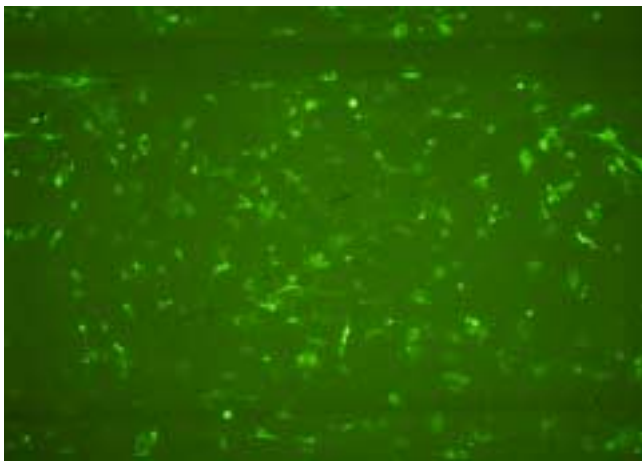


Abb. 25: Mikroskopische Aufnahme von SC-Zellen, nach 30-minütiger Inkubation mit Alexa®488-markiertem TeNT, einfach gewaschen. (100x, Anregungswellenlänge 490 nm)

Ein retrograder axonaler Transport im 3-Kammer-Kultursystem konnte nur bei SC – Neuronen, jedoch nicht bei DRG-Neuronen beobachtet werden (siehe Abb. 26, 27, 29 und 30).



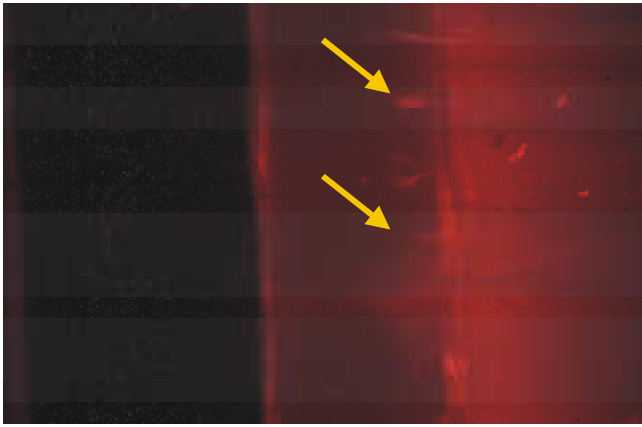


Abb. 26: Mikroskopische Aufnahme von DRG-Zellen/-Axonenbündel, 2 Stunden nach Zugabe von Alexa@546-markiertem TeNT (und Hc-FITC) in die Seitenkammer des Kultursystems. Bildausschnitt zeigt Zentralkammer (links, dunkel), Seitenkammer (rechts, rote Hintergrundfluoreszenz durch das zugegebene TeNT-A546) und trennende Teflon-Barriere (blass rötlich fluoreszierender senkrechter Streifen in der Bildmitte). Bündel von Axonen unter der Teflonbarriere (axonales Wachstum von links nach rechts), Zellsomata liegen links (nicht erkennbar). Rote Fluoreszenz von Zellfortsätzen in der Seitenkammer durch TeNT-A546 (Nachweis der Bindung), aber auch nach 2-stündiger Inkubation (37°C, 10 % CO<sub>2</sub>) Fluoreszenz nur bis zum ersten Drittel der Barriere (Pfeile) nicht fortschreitend zum Zellsomata. (kein Transport innerhalb der Zellen). (80x, Anregungswellenlänge 546 nm)

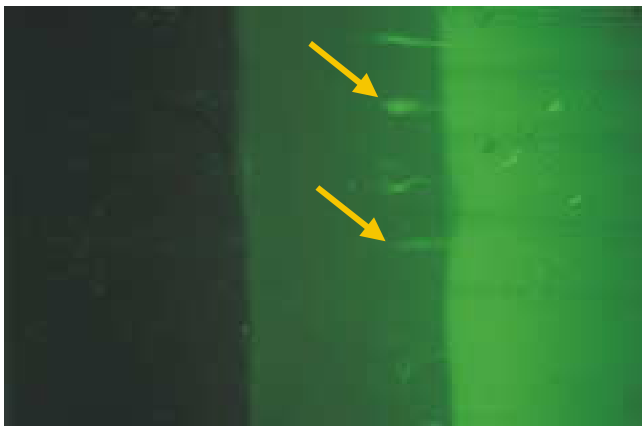


Abb. 27: Gleicher Bildausschnitt wie in Abb. 26. Grüne Fluoreszenz durch Hc-FITC. Ebenfalls Bindung, aber kein Transport beobachtbar. (80x, Anregungswellenlänge 490 nm)

In den Abbildungen 26 und 27 ist eine Anfärbung der Axonbündel unter der Barriere (bis zu den mit Pfeilen gekennzeichneten Stellen) erkennbar. Es handelt sich vermutlich um einen Diffusionsphänomen, bei dem die Testsubstanz einige Mikrometer in den methocelgefüllten Spalt zwischen Siliconfett (unter dem Tefloninsert) und dem Kollagen (auf dem Boden der Kulturschale) hineindiffundiert. Das markierte Protein wurde nicht innerhalb der Zelle transportiert, sondern lagerte sich an die Zelloberfläche an.

Als Kontrolle wurde die unspezifische Bindung durch 12-stündige Inkubation der Zellen mit TRITC-markiertem BSA überprüft (Abb. 28).



Abb. 28: Mikroskopische Aufnahme von SC-Zellen, nach 12-stündiger Inkubation mit TRITC-markiertem BSA, mehrfach gewaschen. (400x, Anregungswellenlänge 546 nm)

Es lässt sich bei der Kontrolle mit BSA-TRITC eine geringe unspezifische Bindung erkennen, die sich jedoch erst nach langer Inkubation (hier: 12 Stunden) darstellt. Eine Bindung nach weniger als 6 Stunden war nicht zu beobachten. Bei den Bindungs- und Transport-Experimenten wurde i.d.R. 5 bis 60 Minuten mit den markierten Toxinen und Fragmenten inkubiert. In Parallelversuchen konnte bei gleichzeitiger Inkubation mit TeNT-Alexa®488 und BSA-TRITC sowohl die Bindung und der Transport des markierten TeNT, als auch Nichtbindung des markierten BSA gezeigt werden.

Im Parallelversuch mit FITC-markiertem nativen Hc konnte bei gleichzeitiger Inkubation mit TeNT-Alexa®546 und Hc-FITC Bindung und Transport beider Substanzen an SC-Neuronen gezeigt werden (siehe Abb. 29 und 30).

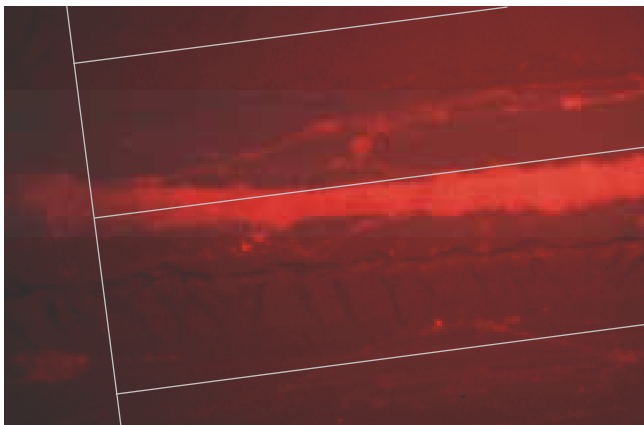


Abb. 29: Mikroskopische Aufnahme von SC-Zellen/-Axonenbündel, 30 Minuten nach Zugabe von Alexa@546-markiertem TeNT (und  $H_C$ -FITC) in die Seitenkammer des Kultursystems. Bildausschnitt zeigt Bündel von Axonen unter der Teflonbarriere (Bildmitte, axonales Wachstum von links nach rechts), Zellsomata links erkennbar. Rote Hintergrundfluoreszenz durch Tefloninsert (schraffiert). Transportiertes TeNT erreicht von rechts kommend (Seitenkammer nicht mehr im Bildausschnitt) gerade an dieser Stelle die Zellsomata. Rote Fluoreszenz durch TeNT-A546. (600x, Anregungswellenlänge 546 nm)

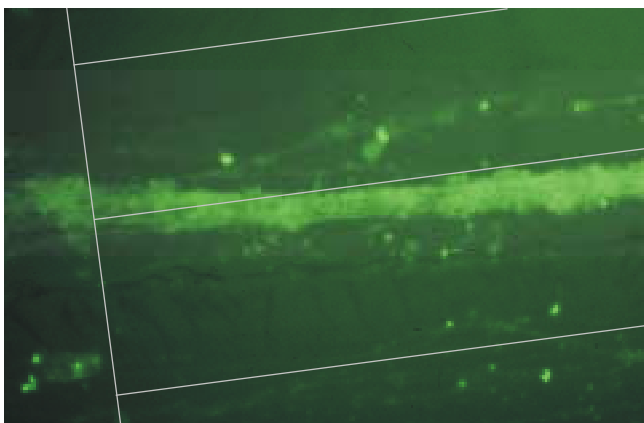


Abb. 30: Gleicher Bildausschnitt wie in Abb. 29, hier ist in der unteren Bildhälfte auch eine gekratzte Leitstruktur erkennbar. Grüne Fluoreszenz durch  $H_C$ -FITC. (600x, Anregungswellenlänge 490 nm)

Der Transport von nativen, Alexa@488-markiertem TeNT in SC-Neuronen, aber auch gleichzeitig die Dichtigkeit des eingesetzten Kammer-Kultursystems kann bei der detaillierten Betrachtung der Versuche demonstriert werden: Einzelne Axone und die zugehörigen Zellkörper in der zentralen Kammer wurden durch das in die Seitenkammer zugesetzte fluoreszenzmarkierte TeNT selektiv angefärbt, während die Zellen ohne direkte axonale Verbindung in das Seitenkompartiment nicht angefärbt wurden (s. Abb. 31 und 32)

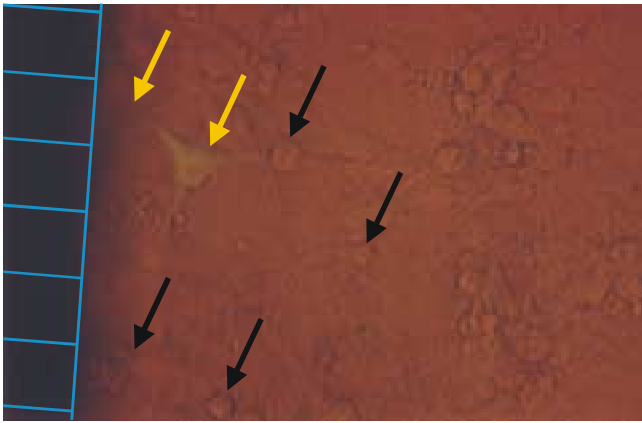


Abb. 31: Mikroskopische Aufnahme von SC-Zellen/-Axonen, 30 Minuten nach Zugabe von Alexa®488-markiertem TeNT in die Seitenkammer des Kultursystems. Der Bildausschnitt zeigt Zellsomata in der Zentralkammer axonales Wachstum von rechts nach links), Tefloninsert am linken Bildrand (dunkler Streifen) erkennbar. Transportiertes TeNT erreicht von links kommend (Seitenkammer nicht mehr im Bildausschnitt) gerade an dieser Stelle ein Zellsomata (vgl. Abb. 32). Grüne Fluoreszenz durch TeNT-A488. (400x, Anregungswellenlänge 490 nm und Phasenkontrast)



Abb. 32: Gleicher Bildausschnitt wie in Abb. 31 (400x, Anregungswellenlänge 490 nm)

Die Fluoreszenz der Alexa®-Fluorophore ist sehr stabil. Kurzzeitige Lagerung bei + 4 °C und mehrwöchige Lagerung bei – 20 °C überstanden die markierten Proteine unbeschadet. Bei Kontrollen konnten eine gute Proteinbindung einerseits (SDS-PAGE) und eine gute Fluoreszenz andererseits (Kontrolle unter UV-Licht 254 und 366 nm) beobachtet werden. Innerhalb der Versuchsreihen zeichneten sich die Alexa®-markierten Toxine und Fragmente durch eine gute Stabilität gegenüber UV-bedingtem Ausbleichen aus. Es war ohne ein merkbares Nachlassen der Fluoreszenz möglich, die Zellen mehrfach für einige Minuten zu mikroskopieren. Eine Quantifizierung des Ausbleichens war mit den genutzten Versuchsaufbauten nicht möglich. Quenchingeffekte im Zusammenhang mit den verwendeten Medien wurden nicht beobachtet.

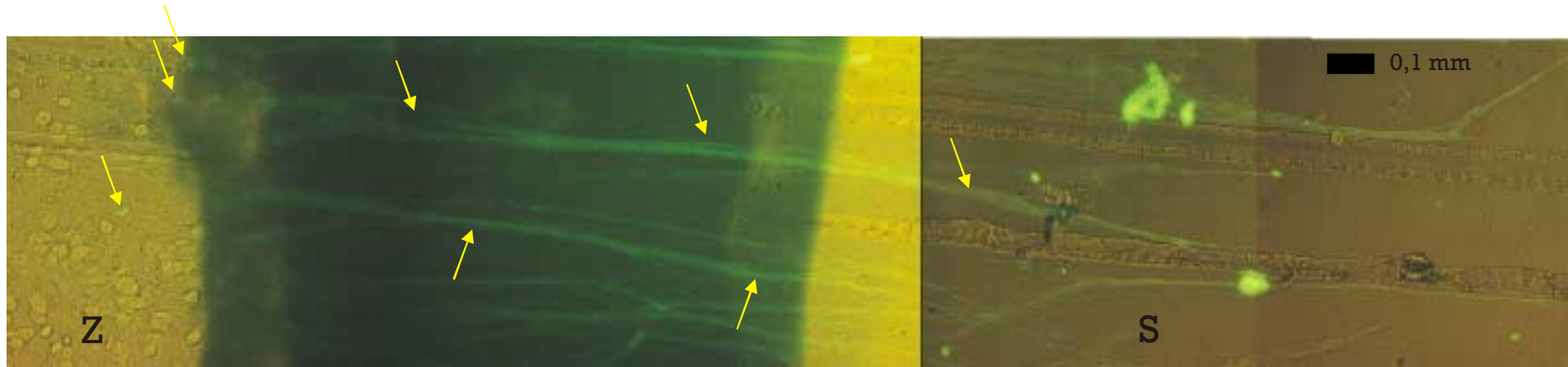


Abb. 33: SC-Zellen im 3-Kammerkultursystem.  
 Blick von unten auf die Zentralkammer (Z) mit Zellsomata (links), Teflonbarriere zwischen Zentral- und einer Seitenkammer (dunkler Bereich mit durchgewachsenen Axonen (Pfeile) und Seitenkammer (S), ebenfalls mit Axonen (rechts).  
 Gekratzte Rillen sind als waagrecht verlaufende Strukturen zu erkennen.  
 Aufnahme in UV (490 nm) - und Phasenkontrastbeleuchtung 30 Minuten nach Inkubation mit Alexa®488 markiertem nativem TeNT in die Seitenkammer mit anschließendem Waschen.  
 Gut zu verfolgen ist die starke Anfärbung der Zellfortsätze in der Seitenkammer, die sich in Richtung der Zellkörper fortsetzende Anfärbung der Axone (Pfeile), die jedoch unter der Barriere von rechts nach links etwas abnimmt. Einige Zellkörper in der Zentralkammer sind deutlich angefärbt (Pfeile linke Bildhälfte), einige nicht.  
 (400x, Anregungswellenlänge 490 nm und Phasenkontrast)

In Abbildung 33 ist das 3-Kammer-Kultursystem noch mal aus zusammengesetzten mikroskopischen Bildern zu sehen. Links ist die Zentralkammer mit den Zellsomata, und rechts die Seitenkammern mit den dorthin ausgesprossenen Axonen erkennbar. Die Aufnahme wurde mit UV- (490 nm) und Phasenkontrast-Beleuchtung aufgenommen.

Die Fluoreszenz der mit Alexa®350-markierten Proteine ist - bei vergleichbaren Konzentrationsverhältnissen - deutlich dunkler, als die der beiden anderen eingesetzten Alexa®-Fluorophore. Die fotografische Dokumentation war qualitativ zusätzlich erheblich schlechter. Die Ursache für diesen Effekte könnten unterschiedlichen Empfindlichkeiten des eingesetzten Filmmaterials für die emittierten Wellenlängen bzw. Farben der verschiedenen Alexa®-Fluorophore sein.

Eine Abnahme der Bindungsfähigkeit des TeNT-Alexa®488 (auch -546 und -350) wurde nach 8-wöchiger Lagerung bei + 4°C beobachtet. Der Verlust wurde auch bei den rekombinant hergestellten Toxinen bzw. Fragmenten beobachtet, er trat hier jedoch z.T. schon nach wenigen Tagen auf. Da sich bei gelelektrophoretischen Kontrollen unveränderte große und fluoreszenzmarkierte Proteine darstellten, können Proteolyse und Dissoziation des Fluorophores ausgeschlossen werden. Die Abnahme der Bindungsfähigkeit scheint also auf einer Abnahme der Bindungsaktivität zu beruhen.

Als wesentliche Ergebnisse der Experimente mit fluoreszenzmarkiertem nativem Tetanustoxin und H<sub>C</sub> (Fragment C) lassen sich zusammenfassen, dass der positive Nachweis der Bindung und des Transportes im 3-Kammer-Kultursystem an Rückenmarksneuronen sicher möglich war. An DRG-Neuronen war lediglich eine Bindung nachweisbar.

Wie bereits dargestellt, hatte das Alexa®488-fluoreszenzmarkierte native TeNT eine deutlich verringerte Toxizität im Test am isolierten Zwerchfell der Maus.

## 4.2 Rekombinante Tetanustoxine

Um schrittweise die Eigenschaften rekombinanter Tetanustoxine und Fragmente beschreiben zu können, wurden zunächst rekombinante Toxine mit den entsprechenden Aufreinigungstags hergestellt und nach einer chemischen Fluoreszenzmarkierung auf Bindung und Transport getestet.

Die rekombinanten Toxine wurden ohne und mit Mutationen der im Konstrukt enthaltenen nativen Sequenz eingesetzt. Die Mutationen waren bei den ersten Konstrukten technisch bedingt (Einbau von M und A zwischen den nativen A<sup>457</sup> und S<sup>458</sup>), bzw. wurden zunächst zur Inaktivierung der leichten Kette (Austausch H<sup>233</sup> in V<sup>233</sup> und E<sup>234</sup> in Q<sup>234</sup>) eingeführt. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte wie beschrieben durch rekombinante Konjugation mit GFP oder nachträgliche chemische Fluoreszenzmarkierung.

Die Nomenklatur entspricht der in Tabelle 1 Verwendeten; die Auflistung der Ergebnisse entspricht nicht der chronologischen sondern einer systematischen Reihenfolge.

### 4.2.1 TeNT<sub>VQ</sub>-H<sub>6</sub>-Alexa®350

Rekombinantes TeNT-Toxoid mit His<sub>6</sub>-tag bindet nach der Fluoreszenzmarkierung mit Alexa®350 an DRG- und SC-Neurone. Ein Transport war nur bei SC-Neuronen zu beobachten. Da sich die Fluoreszenz des mit Alexa®350-markierten Toxoids im Vergleich mit Alexa®488-markierten Konstrukten darstellte, wurde das Alexa®350 im Folgenden nicht mehr eingesetzt.

### 4.2.2 TeNT-H<sub>6</sub>-Alexa®488

Rekombinantes TeNT mit His<sub>6</sub>-tag bindet nach der Fluoreszenzmarkierung mit Alexa®488 an DRG- und SC-Neurone (siehe Abb. 34). Im 3-Kammer-Modell konnte ein Transport des rekombinanten Produktes in SC-Neuronen, nicht aber in DRG-Neuronen beobachtet werden.

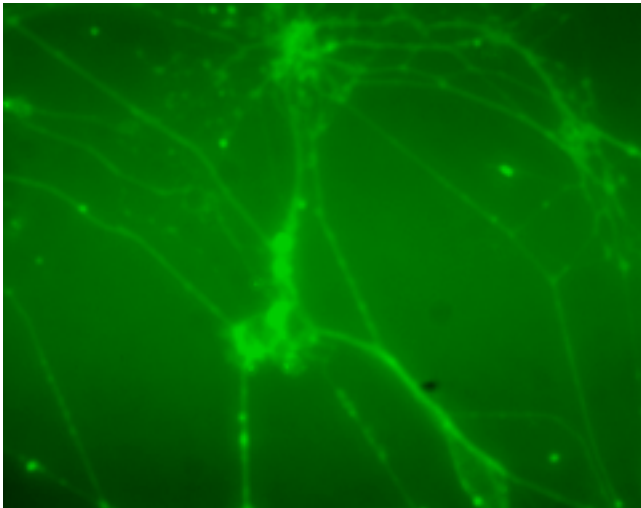


Abb. 34: Mikroskopische Aufnahme von SC-Zellen, 60 Minuten nach Zugabe von Alexa@488-markiertem TeNT-H<sub>6</sub> auf Zellkörper und -fortsätze. Das markierte TeNT-H<sub>6</sub> bindet an die Zellen. (400x, Anregungswellenlänge 490 nm)

Die Bindung des rekombinanten TeNT wird offensichtlich durch den am C-Terminus des Gesamtoxins angehängten His-6-tag (H<sub>6</sub>) nicht behindert. Auch Aufnahme und Transport konnten weiter beobachtet werden. Wie bei den unter 4.1.2 dargestellten Versuchen mit nativem TeNT wurde Bindung immer an DRG- und SC-Neuronen beobachtet, der Transport erfolgte jedoch auch hier nur in Rückenmarksneuronen.

Im Toxizitätstest am isolierten Zwerchfell der Maus wurde eine Verminderung der Toxizität des rekombinanten Toxins mit His-6-tag gegenüber dem nativen TeNT um den Faktor 3-5 festgestellt. Das ebenfalls getestete Alexa@488-markierte TeNT-His<sub>6</sub> war ähnlich toxisch wie das unmarkierte rekombinante TeNT-His<sub>6</sub>.

#### 4.2.3 TeNT<sub>VQ</sub>-S-Alexa@546

Rekombinantes TeNT<sub>VQ</sub>-S bindet nach der Fluoreszenzmarkierung mit Alexa@546 an DRG- und SC-Neurone. Ein Transport war nur bei SC-Neuronen zu beobachten (siehe Abb. 35).

Die rekombinante Konjugation eines Strep@-tagII an TeNT und die anschließende Fluoreszenzmarkierung verändern die Eigenschaften des TeNT offensichtlich nur in so geringem Maße, dass Bindung und Transport trotzdem noch möglich sind. Im Toxizitätstest am isolierten Zwerchfell der Maus konnte bei der „VQLIH“-Doppelmutante TeNT<sub>VQ</sub>-S keine Toxizität mehr festgestellt werden. Ebenfalls



dargestellte – aber nicht in der Zellkultur getestete – Einzelmутanten zeigten dagegen noch eine geringe Resttoxizität.

Der Strep®-tagII ist geringfügig größer (8 AS) als der His<sub>6</sub>-tag (6 AS). Bei beiden tags wurde als Spacer noch eine PPTPG-Sequenz zwischen C-Terminus des jeweiligen Proteins eingefügt. In einigen Fällen (Hc<sub>1281-1315</sub>TeNT-His<sub>6</sub> mit und ohne GFP, siehe Tab. 1 und 4.3.5 und 4.3.6) wurde eine Thrombin-Schnittstelle eingebaut, um den tag abspalten zu können. Dieses erwies sich jedoch nach den hier dargestellten Ergebnissen als nicht erforderlich, da die tags Bindung und Transport des rekombinanten Materials nicht behindern.

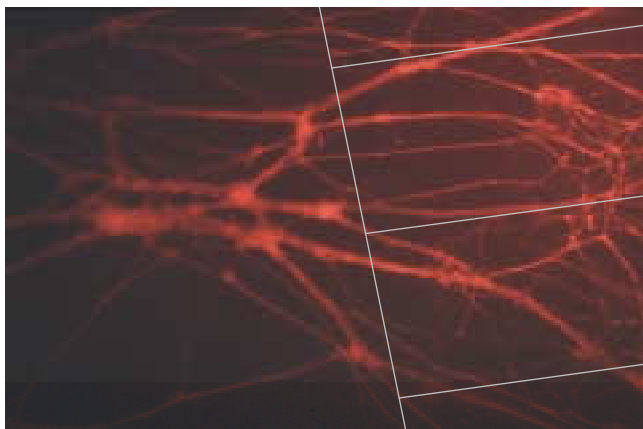


Abb. 35: Mikroskopische Aufnahme von SC-Zellen/-Axonenbündel, 60 Minuten nach Zugabe von Alexa®546-markiertem TeNT<sub>VQ</sub>-S in die Seitenkammer des Kultursystems. Der Bildausschnitt zeigt Bündel von Axonen unter der Teflonbarriere (axonales Wachstum von links nach rechts), Zellsomata sind links erkennbar. Rote Hintergrundfluoreszenz durch Tefloninsert (schraffiert) in der rechten Bildhälfte. Transportiertes TeNT<sub>VQ</sub>-S-A546 erreicht von rechts kommend (Seitenkammer nicht mehr im Bildausschnitt) gerade an dieser Stelle die Zellsomata. Rote Fluoreszenz durch TeNT<sub>VQ</sub>-S-A546. (600x, Anregungswellenlänge 546 nm)

#### 4.2.4 TeNT-S-Alexa®488

Rekombinantes TeNT-S bindet nach der Fluoreszenzmarkierung mit Alexa®488 an DRG- und SC-Neurone. Ein Transport war wieder nur bei SC-Neuronen zu beobachten. Im Zusammenhang mit diesen Experimenten konnte der zeitliche Verlauf des Transportes im Zellfortsatz beobachtet werden, nach der Zugabe des Alexa488-markierten TeNT-S wurden von dem gleichen Axon zwei Aufnahmen im Abstand von 8 Minuten gemacht (siehe Abb. 36 und 37). Eine Quantifizierung konnte auf der Basis des zur Verfügung stehenden Mikroskops nicht durchgeführt werden, es erscheint aber prinzipiell möglich, die intrazelluläre Transportgeschwindigkeit zu messen.

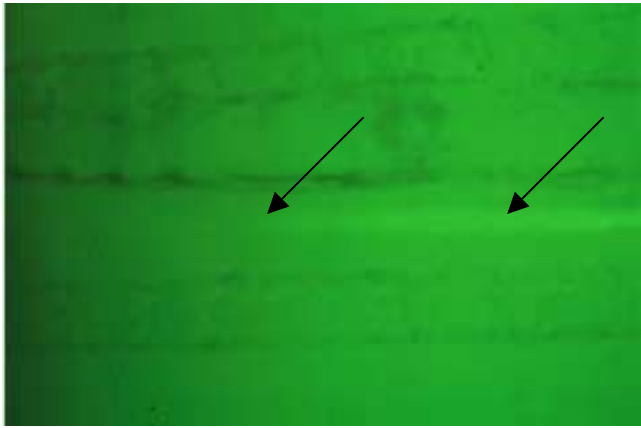


Abb. 36: Mikroskopische Aufnahme von SC-Zell-Axonen (Pfeile, unter der Barriere, grüne Hintergrundfluoreszenz durch Tefloninsert), 15 Minuten nach Zugabe von Alexa®488-markiertem TeNT-S in die Seitenkammer (links, nicht im Bildausschnitt). Transport des in Richtung der Zentralkammer rechts (dunkler Bereich am rechten Bildrand) des Kultursystems. (600x, Anregungswellenlänge 490 nm)

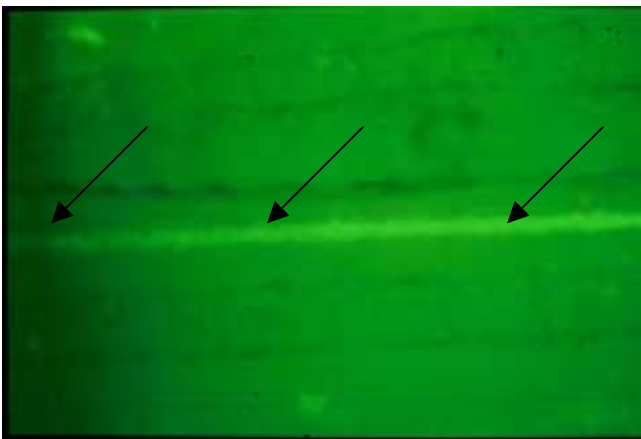


Abb. 37: Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 36, 8 Minuten später. Der markierte Axon-Abschnitt reicht weiter in Richtung der Zentralkammer. (600x, Anregungswellenlänge 490 nm)

Im Toxizitätstest am isolierten Zwerchfell der Maus wurde eine deutliche Verminderung der Toxizität des rekombinanten Toxins mit Strep®-tagII gegenüber dem nativen TeNT festgestellt. Das ebenfalls getestete A488-markierte TeNT-S war genau so untoxischer als das unmarkierte TeNT-S.

#### 4.2.5 GFP-TeNT-S

Da die nachträgliche Fluoreszenzmarkierung nur begrenzt definiert und reproduzierbar durchgeführt werden kann, erschien eine rekombinante Konjugation mit einem Green Fluorescence Protein (GFP) in der Versuchsplanung als bessere Alternative. Es entfallen hierbei zusätzlich die durch die nachträgliche chemische Markierung möglichen Aktivitätsverluste z.B. durch die Reaktionszeit bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt, mechanische (z.B. Rührer) oder chemische (z.B. pH-Wert) Einflüsse. Bei einer rekombinanten Herstellung könnte die Markierung gleichzeitig in einem einzigen Arbeitsschritt mit deutlicher Kosten- und Zeitersparnis durchgeführt werden.

Das GFP hat mit seiner Größe (ca. 26 kD) jedoch eine andere Dimension als die verwendeten chemischen Fluorophore (0,41 – 1,079 kD). Da die hier verwendeten Fluorophore wie unter 2.5 dargestellt mit primären Aminogruppen reagieren, erfolgt die chemische Fluoreszenzmarkierung durch mehrere Fluorophormoleküle pro Proteinmolekül. Eine mögliche Änderungen der Eigenschaften bzw. der Aktivität durch die eine oder die andere Markierungsmethode lässt sich bei der Größe des TeNT-Moleküls nicht vorhersagen.

Es konnte keine Bindung von GFP-TeNT-S an DRG oder SC-Neuronen nachgewiesen werden (siehe Abb. 38 und 39).



Abb. 38: Mikroskopische Aufnahme von DRG-Zellen/-Axonen, 60 Minuten nach Zugabe von GFP-TeNT-S auf die ganzen Zellen, 3 x gewaschen. (400x, Phasenkontrast)



Abb. 39: Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 38. Keine Fluoreszenz, keine Bindung des GFP-TeNT-S erkennbar. (400x, Anregungswellenlänge 490 nm)

Auch die Kontrolle mit unkonjugiertem GFP zeigte keine Bindung.

Das rekombinante GFP-TeNT-S-Konjugat wurde nachträglich noch mal mit Alexa®488 fluoreszenzmarkiert, um auszuschließen, dass u.U. lediglich die Fluoreszenz des GFP-Konjugates nicht für einen positiven Nachweis ausreichte. Auch das nachträglich mit Alexa®488 markierte GFP-TeNT-S zeigte keine Bindung an DRG- oder SC-Zellen.

Die Konjugation des GFP-Moleküls an das N-terminale Ende des TeNT führt zu einer Verhinderung von Bindung und Transport des Moleküls, obwohl das GFP in diesem Fall nach den bisherigen experimentellen Befunden der N-Terminus (die leichte Kette, LC) nicht für die Bindung verantwortlich ist.

#### 4.2.6 TeNT-GFP-S

Das Konstrukt TeNT-GFP-S zeigte im Gegensatz zu dem vorher beschriebenen GFP-TeNT-S Bindung an DRG- wie auch SC-Neurone, bei den SC-Neuronen konnte sogar Transport beobachtet werden.

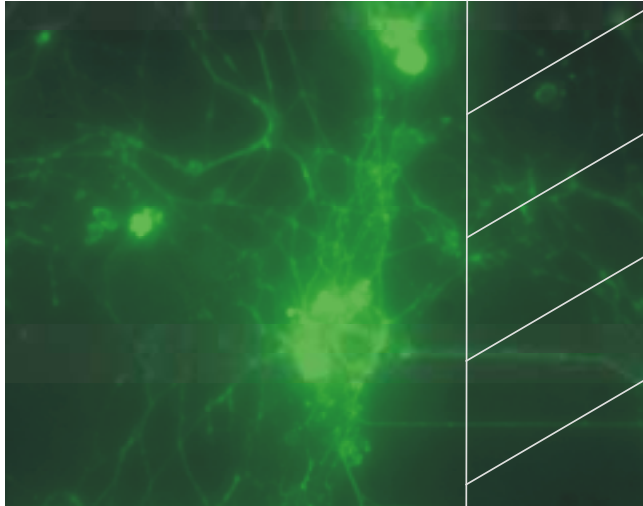


Abb. 40: Mikroskopische Aufnahme von SC-Zellen/-Axonen, 45 Minuten nach Zugabe von TeNT-GFP-S in die Seitenkammer des Kultursystems.

Der Bildausschnitt zeigt Bündel von Axonen unter der Teflonbarriere (axonales Wachstum von links nach rechts), Zellsomata sind links erkennbar. Tefloninsert (schraffiert) in der rechten Bildhälfte. Transportiertes TeNT-GFP-S erreicht von rechts kommend (Seitenkammer nicht mehr im Bildausschnitt) die Zellsomata. (400x, Anregungswellenlänge 490 nm)

Eine Markierung mit GFP am C-Terminus der schweren Kette des TeNT – und damit im Bereich der für die Bindung verantwortlichen Domäne - verhindert offensichtlich nicht zwangsläufig Bindung und Transport des Moleküls.

### 4.3 Rekombinante TeNT-Fragmente

Mit der genannten Zielsetzung einer Eingrenzung der für Bindung und Transport verantwortlichen Domäne im Tetanustoxin wurden, wie unter 2.4 beschrieben auch rekombinante Fragmente des TeNT hergestellt, die aus dem Bereich der schweren Kette stammen. Die schwere Kette, besonders der C-Terminus der schweren Kette, wird nach den bislang vorliegenden Experimentalbefunden für Bindung und Aufnahme des Gesamtmoleküls verantwortlich gemacht. Bindungs- und Transportversuche mit FITC-markiertem nativem H<sub>C</sub> waren positiv ausgefallen (siehe 4.1.2).

#### 4.3.1 H<sub>C</sub> (865-1315)TeNT-S-Alexa@488

Das H<sub>C</sub> (865-1315)TeNT-S wurde mit Alexa@488 fluoreszenzmarkiert und auf Bindung und Transport getestet.

Es konnte Bindung an DRG- (siehe Abb. 40 und 41) und SC-Neurone beobachtet werden.

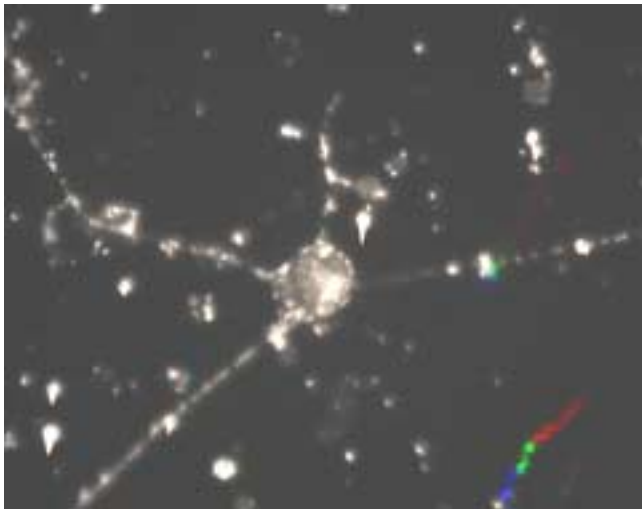


Abb. 41: Mikroskopische Aufnahme von DRG-Zellen/-Axonen, 60 Minuten nach Zugabe von H<sub>C</sub> (865-1315)TeNT-S-Alexa@488 auf die Zellen, 3 x gewaschen. (400x, Anregungswellenlänge 490 nm)

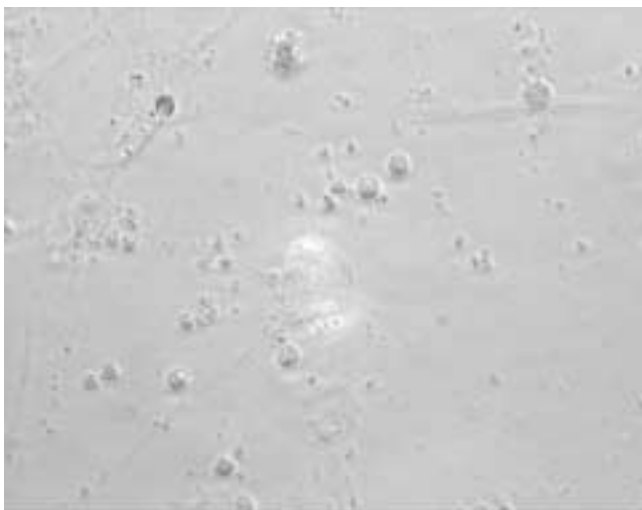


Abb. 42: Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 41. In der Bildmitte der Zellkörper eines DRG-Neurons (400x, Phasenkontrast)

Ein Transport war im 3-Kammer-Kultursystem nur mit SC-Neuronen nachweisbar (siehe Abb. 43 und 44).



Abb. 43: Mikroskopische Aufnahme von SC-Zellen/-Axonen, 60 Minuten nach Zugabe von  $H_C^{(865-1315)}$  TeNT-S-Alexa®488 auf die Zellen, 3 x gewaschen. Blick von unten auf die Barriere. Zellkörper links (Zentralkammer, linker Pfeil), Axon (Pfeile) mit Wachstum von links nach rechts. (400x, Anregungswellenlänge 490 nm)

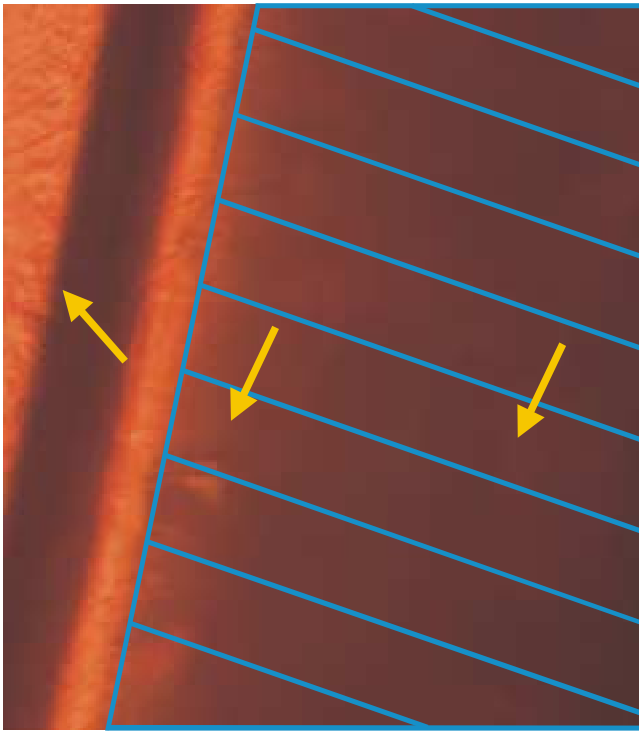


Abb. 44: Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 43. Rand des Silikonfettes als dunkler Streifen in der linken Bildhälfte. Zentralkammer links vom dunklen Streifen, rechts davon Blick unter die Barriere. Zellstrukturen sind hier nicht erkennbar. (400x, Phasenkontrast)



#### 4.3.2 GFP-H<sub>C</sub> (865-1315)TeNT-S

Zum direkten Vergleich wurde auch das GFP-Konjugat des vorher beschriebenen H<sub>C</sub> 865-1315 TeNT-S auf Bindung und Transport getestet. Bindung und Transport waren bei diesem Konjugat ebenfalls nachweisbar.



Abb. 45: Mikroskopische Aufnahme von DRG-Zellen/-Axonen, 60 Minuten nach Zugabe von GFP-H<sub>C</sub> (865-1315)TeNT-S auf die Zellen, gewaschen. (400x, Anregungswellenlänge 490 nm)

Die erkennbare Fluoreszenz erscheint gerade im direkten Vergleich zu dem vorher beschriebenen chemisch fluoreszenzmarkiertem Konstrukt bei vergleichbaren Belichtungszeiten heller.



Abb. 46: Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 45. In der Bildmitte der Zellkörper eines DRG-Neurons (400x, Phasenkontrast)

Der Transport des GFP-H<sub>C</sub> (865-1315)TeNT-S war im 3-Kammer-Kultursystem an SC-Neuronen beobachtbar.

#### 4.3.3 H<sub>C</sub> (1110-1315)TeNT-S-Alexa®488

Zur Eingrenzung der Bindungs- bzw. Transportdomänen wurde zunächst eine Verkürzung von H<sub>C</sub> auf die 205 C-terminalen Aminosäuren vorgenommen und ein entsprechenden Konstrukt dargestellt und getestet. Gerade die C-terminale Domäne von H<sub>C</sub> soll zumindest für die Bindung des Fragmentes bzw. Toxins verantwortlich sein.

Das H<sub>C</sub> (1110-1315)TeNT-S (mit Strep®-tagII) wurde zunächst mit Alexa®488 markiert; in einem weiteren Versuchsansatz wurde das gleiche Fragment mit GFP-konjugiert dargestellt und getestet, siehe 4.3.4.

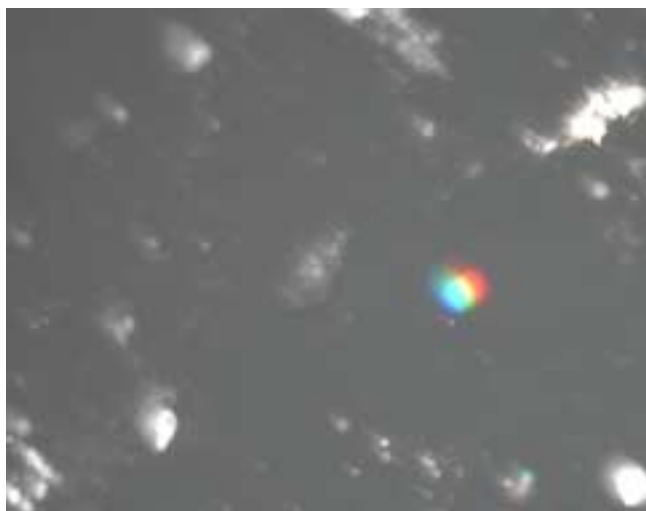


Abb. 47: Mikroskopische Aufnahme von DRG-Zellen/-Axonen, 60 Minuten nach Zugabe von H<sub>C</sub> (1110-1315)TeNT-S-A488 auf die Zellen, gewaschen. (400x, Anregungswellenlänge 490 nm)



Abb. 48: Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 47. In der Bildmitte der Zellkörper eines DRG-Neurons (400x, Phasenkontrast)

Es konnte Bindung an DRG- und SC-Neuronen sowie Transport in SC-Neuronen nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz erschien schwach aber eindeutig.

#### 4.3.4 GFP-H<sub>C</sub> (1110-1315)TeNT-S

Bei Versuchen mit dem Konstrukt GFP-H<sub>C</sub> (1110-1315)TeNT-S war weder Transport noch Bindung an DRG- oder SC-Neurone nachweisbar.

Während diese Konstrukt ohne GFP mit nachträglicher Fluoreszenzmarkierung mit Alexa®488 noch an DRG- und SC-Zellen bindet und in SC-Zellen transportiert wird, ist bei dem GFP-konjugierten Konstrukt eine Bindung an beide Zelltypen nicht mehr nachweisbar. Das GFP ist am N-Terminus des Konstruktes eingefügt, der C-Terminus ist wieder nur um die Strep-II® Sequenz erweitert, die sich in verschiedenen vorher dargestellten Experimenten als per se nicht als Ausschlussgrund für Bindung und Transport dargestellt hat.

#### 4.3.5 H<sub>C</sub> (1281-1315)TeNT-H<sub>6</sub>-Alexa®488

Bei Versuchen mit dem Alexa®488 markiertem Konstrukt H<sub>C</sub> (1281-1315)TeNT-H<sub>6</sub> war weder Transport noch Bindung an DRG- oder SC-Neurone nachweisbar.

#### 4.3.6 GFP-H<sub>C</sub> (1281-1315)TeNT-H<sub>6</sub>

Bei Versuchen mit dem Konstrukt GFP-H<sub>C</sub> (1281-1315)TeNT-H<sub>6</sub> war weder Transport noch Bindung an DRG- oder SC-Neurone nachweisbar.

#### 4.3.7 H<sub>6</sub>-H<sub>C</sub> (865-1112)TeNT-Alexa®488

Bei Versuchen mit dem Alexa®488 markiertem Konstrukt H<sub>6</sub>-H<sub>C</sub> (865-1112)TeNT war weder Transport noch Bindung an DRG- oder SC-Neurone nachweisbar.

#### 4.3.8 LH-H<sub>N</sub> (2-1112)TeNT-S-Alexa®488

Bei Versuchen mit dem Alexa®488 markiertem Konstrukt LH-H<sub>N</sub> (2-1112)TeNT-S war weder Transport noch Bindung an DRG- oder SC-Neurone nachweisbar.

#### 4.3.9 LH-H<sub>N</sub> (2-876)TeNT-S-Alexa®488

Bei Versuchen mit dem Alexa®488 markiertem Konstrukt LH-H<sub>N</sub> (2-876)TeNT-S war weder Transport noch Bindung an DRG- oder SC-Neurone nachweisbar.

#### 4.3.10 H<sub>C</sub> (865-899)TeNT-H<sub>6</sub>-Alexa®488

Bei Versuchen mit dem Alexa®488 markiertem Konstrukt H<sub>C</sub> (865-899)TeNT-H<sub>6</sub> war weder Transport noch Bindung an DRG- oder SC-Neurone nachweisbar.

#### 4.3.11 GFP-H<sub>C</sub> (865-899)TeNT-H<sub>6</sub>

Bei Versuchen mit dem Konstrukt GFP-H<sub>C</sub> (865-899)TeNT-H<sub>6</sub> war weder Transport noch Bindung an DRG- oder SC-Neurone nachweisbar.

## 5. Diskussion und Ausblick

Die Botulinumtoxine wirken an der motorische Endplatte, während TeNT die Exozytose in hemmenden Neuronen im Rückenmark stört. Die „Dichain“-Toxine (BoNT und TeNT) werden durch rezeptorvermittelte Endozytose von den Neuronen aufgenommen und via Axone in das Rückenmark transportiert. TeNT wird dort aus dem Zellsoma freigesetzt und anschließend von (hemmenden) Interneuronen aufgenommen. Die Ursache für das unterschiedliche „Routing“ ist in den Molekülstrukturen der schweren Kette der Clostridientoxine zu suchen. Die Kenntnis der verantwortlichen Domänen in den verschiedenen Toxinen und der entsprechenden Rezeptoren auf neuronalen Zellen könnte neue Wege für pharmakologische Substanzen in das Nervensystem hinein ermöglichen.

Bindung, Transport und Wirkung der Clostridientoxine wurde in verschiedenen Systemen untersucht, z.B. an der neuromuskulären Verbindung (Ambache und Lippold 1949; Hensel et al. 1973; Wernig et al. 1977; Dolly et al. 1984), an motorischen Neuronen (Black und Dolly 1986a, b) und in neuronaler Zellkultur (Dimpfel et al. 1975, 1977; Bergey et al 1987). In jüngster Zeit wurden Thesen zur Struktur-Wirkungsbeziehung auf der Basis von Strukturmodellen im Vergleich zu anderen porenbildenden Toxinen und nach berechneten Elektronenverteilungen formuliert (Lacy und Stevens 1999; Lacy et al. 1998).

Es wurde abgeleitet, dass den drei abgrenzbaren Domänen (LC, H<sub>N</sub> und H<sub>C</sub>) jeweils einzelne Funktionen zukommen:

- LC (AS 1-458, vgl. Abb. 2) ist für die Proteolyse der SNARE-Proteine verantwortlich (Stecher et al. 1989a, b; Ahnert-Hilger et al. 1989; Bittner et al. 1989; Dayanithi et al. 1990, 1992; dePavia und Dolly 1990; Schiavo et al. 1992a, b, c, 1993a, b; Link et al. 1992; Blasi et al. 1993a, b; Hayashi et al. 1994).
- H<sub>N</sub>, der N-Terminus (AS 457-864, vgl. Abb. 2) von HC, scheint wesentlich an der Translokation des Toxins in die Zelle hinein verantwortlich zu sein, obwohl experimentell nur eine Porenbildung mit einer Durchlässigkeit für verschiedene Kationen nachgewiesen wurde. Für die Translokation von Proteinen von der Größe der Clostridientoxine oder ihrer Fragmente gibt es momentan nur die Hypothese, dass sie ebenfalls im Zusammenhang mit der von H<sub>N</sub> verursachten

Porenbildung steht (Gambale und Montal 1988, Schiavo et al. 2000). Die experimentelle Bestätigung dieser Annahme wurde noch nicht erbracht.

- $H_C$ , der C-Terminus (AS 865-1315, vgl. Abb. 2) von HC, ist den experimentellen Befunden nach wesentlich für die Bindung an neuronalen Zellen verantwortlich (Schiavo et al. 2000). Als Rezeptoren konnten auf den neuronalen Zellen präsente Ganglioside identifiziert werden, obwohl die Bindungsaffinität zu den gangliosidhaltigen Membranen geringer ist, als zu neuronalen Zellen (Montecucco und Schiavo 1995). Es wird deswegen die zusätzliche Bindung an ein weiteres Rezeptormolekül vermutet, welches noch nicht identifiziert ist. Für BoNT/B konnte die Bindung an das Vesikelprotein Synaptotagmin gezeigt werden (Nishiki et al. 1994; Nishiki et al. 1996). Die Bindung erfolgt an den Teil des Synaptotagmins, der in das Lumen des Vesikels hineinragt und erst im Rahmen der Exocytose durch Verschmelzung der vesikulären Membran mit der Zellmembran auf der Zelloberfläche erscheint. Das endozytotische „Recycling“ von vesikulären Proteinen nach der Exozytose ist der wahrscheinlichste Aufnahmemechanismus (Bigalke und Shoer 2000).

Die proteinbindende Domäne der Clostridientoxine konnte ebenfalls noch nicht identifiziert werden (Lacy und Stevens 1999). Die Toxine unterscheiden sich in ihren gangliosid-bindenden Domänen und in der Affinität zu den verschiedenen Gangliosid-Typen (Critchley et al. 1988; Marxen und Bigalke 1989; Marxen et al. 1991; Niemann 1991). Für TeNT wurde gezeigt, dass die gangliosid-bindende Domäne im Bereich der C-terminalen 34 Aminosäuren (AS 1110-1315) der HC bzw.  $H_C$ , (Shapiro et al. 1997) lokalisiert ist.

Die Charakterisierung der Proteindomänen, die für das unterschiedliche „Routing“ der Toxine und damit für die charakteristische klinische Symptomatik von Tetanustoxin- bzw. Botulinumtoxin-Intoxikation verantwortlich ist, stellt verschiedene Anforderungen an einen experimentellen Ansatz. Um die für „Bindung“ und/oder „Transport“ verantwortlichen Domänen experimentell bestätigen zu können, muss ein System mit neuronalen Zellen zur Verfügung stehen, dass zwischen Bindung und Transport diskriminieren kann. Außerdem müssen entsprechende Fragmente und rekombinante Mutanten eines Clostridientoxins zur Verfügung stehen, die

durch ein geeignetes Verfahren nachweisbar sind, ohne dass die Bindungs- bzw. Transporteigenschaften wesentlich verändert werden.

### **5.1 Auswahl und Eignung der ausgewählten Methodik**

Eine Voraussetzung für die experimentelle Charakterisierung einzelner Schritte des oben beschriebenen komplexen Wirkungsmechanismus der Clostridientoxine stellen intakte neuronale Zellen dar, da aktive Leistungen der Zelle selbst für Aufnahme und Transport erforderlich sind. Prinzipiell stehen neuronale Zellen in vivo im Tierversuch oder in vitro in einer neuronalen Zellkultur zur Verfügung.

Für die vorliegende Arbeit wurde die neuronale Zellkultur ausgewählt, da sie im Vergleich zum Tierversuch verschiedene Vorteile mit sich bringt: Die Anzahl der zur Gewinnung von Zellen benötigten Tiere ist wesentlich geringer als bei einem Tierversuch, und die Tiere leiden bei einer sachgerechten Tötung nicht. Mit einem einzelnen bebrüteten Hühnerei bzw. einem Hühnerembryo lassen sich bis zu 30 Einzelversuche realisieren. Die Auswertbarkeit der Daten aus einer Zellkultur und deren Quantifizierung ist einfacher als im komplexeren Versuchstier. Die erforderlichen embryonalen Zellen wurden aus bebrüteten Hühnereiern (des 10.-12. Bruttages) präpariert und zu kultiviert.

Das von Campenot und Sonderegger für Untersuchungen an neuronalen Wachstumsfaktoren und -bedingungen genutzte 3-Kammer-Zellkultur-System (Campenot 1982a, b, 1987, 1994, Sonderegger et al. 1983, Stoeckli et al. 1989, 1996, Kuhn et al. 1991, Vance et al. 1991, Savoca et al. 1995, Senger und Campenot 1997, Kimpinski et al. 1997, de Chaves et al. 1997, Ure und Campenot 1997) bietet die Möglichkeit, neuronale Zellkörper und deren Fortsätze in einem Mehrkompartimentsystem zu kultivieren. In diesem System kann zwischen Bindung und Transport unterschieden werden. Während Campenot und Sonderegger den anterograden Transport (vom Zellkörper der neuronalen Zelle in Richtung der Peripherie/Fortsätze) untersucht hatten, war in meinen Experimenten der retrograde Transport (aus der Peripherie zum Soma) von Interesse. Für diese Untersuchungen wurden aus dem Rückenmark gemischte neuronale Kulturen gewonnen, die u.a. motorischen Rückenmarks-Zellen (Spinal Cord Cells, SC) enthielten.

Die Präparation von Hinterwurzelganglien (Dorsal Root Ganglien, DRG) ermöglichte darüber hinaus Experimente mit sensiblen Zellen.

Die Zellpräparation und -kultur wurde gegenüber verschiedenen Literaturangaben zu der unter 2.6 bzw. 2.7 beschriebenen Methodik optimiert. Die verwendeten Kulturmedien konnten bei gleichbleibenden Wachstumsergebnissen vereinfacht werden, was zu einer Kostenreduktion von rund 50% führte. Die Geometrie der Teflon-Inserts konnte nicht mehr optimiert werden, zum Einsatz kam das bereits von Campenot und Sonderegger beschriebene 3-Kompartiment-Modell mit einer Zentral- und zwei Seitenkammern (Campenot 1982a, b, 1987; Sonderegger et al. 1983).

Für die Untersuchung werden in diesem 3-Kammer-Kultursystem nur kleine Mengen der markierten Toxine und Fragment benötigt. Das gesamte System ist in jedem Zellkulturlabor mit Standardausstattung etablierbar, es würde sich dadurch als einheitliche Methode zum Vergleich von Bindungs- und Transport-Aktivität eignen. Die Kosten für Medien und Verbrauchsmaterialien sind nicht größer als in der Standardzellkultur, die Kosten für die autoklavierbaren, mehrfach verwendbaren Tefloninserts sind gering.

## 5.2 Markierungsverfahren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Markierungsverfahren zum Nachweis der Proteine (radioaktive Markierung, chemische bzw. molekularbiologische Fluoreszenzmarkierung) verwendet. Sie haben sich als unterschiedlich gut geeignet erwiesen.

Die radioaktive Markierung und die anschließende Autoradiographie sind experimentell schwierig durchführbar, dauern lange und führen zu verhältnismäßig schlechten Ergebnissen (siehe auch 4.1).

Um den Verlauf der Markierungen, d.h. den Weg des transportierten Toxins verfolgen zu können, mussten die Tefloninserts vor der Autoradiographie entfernt werden. Die Inserts waren jedoch relativ fest mit dem kollagenisierten Boden der Kulturschalen mit dem Silikonfett verklebt, so dass selbst beim vorsichtigen manuellen Herausheben Teile der Kollagenschicht ebenfalls mit herausgehoben



wurden, und so häufig viele Zellen entfernt wurden. Die Ansätze waren in diesem Fall nicht mehr auswertbar. Variationen der Fixierungstechnik (vor und/oder nach dem Herausheben des Insert, andere Fixierungslösungen) brachten keine Verbesserung der Auswertbarkeitsquote. Nachteilig war außerdem, dass die Entwicklung der Autoradiographie insgesamt rund 14 Tage dauerte und der Hintergrund (Artefakte durch natürliche Hintergrundstrahlung) verhältnismäßig groß war.

Die chemische Fluoreszenzmarkierung hat sehr gute Ergebnisse geliefert. Vor allem die Farbstoffe der hier überwiegend verwendeten Alexa®-Serie zeichnen sich durch einfache Reaktionsführung und Aufreinigung des markierten Produktes, hohe Fluoreszenz-Ausbeute und gute Stabilität aus. Bindung, Translokation und intrazellulärer Transport der verwendeten Proteine wird durch die Fluoreszenzmarkierung offensichtlich nicht wesentlich gestört. Die Kosten für die Farbstoffe der Alexa®-Serie sind verglichen mit den anderen gebräuchlichen Fluorophoren hoch.

### **5.3 Zellspezifität von Bindung und Transport der Proteine**

Für die vorliegende Arbeit wurden sensible Hinterwurzelganglien- (Dorsal Root Ganglien, DRG) und motorischen Rückenmarks-Zellen (Spinal Cord, SC) im 3-Kammer-Kultursystem eingesetzt.

Sowohl die verwendeten Hinterwurzelganglienzellen (DRG), als auch die Rückenmarksneurone (SC) binden die unter 4. beschriebenen Proteine, nur die Rückenmarksneurone transportieren diese Proteine jedoch retrograd aus der Peripherie zum Zellsoma. Ein intrazellulärer Transport konnte in DRG-Neuronen nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide neuronalen Zelltypen einen Teil des vermutlich zweiteiligen Tetanustoxinrezeptors besitzen, denn beide Zelltypen binden das Toxin. Da keines der Proteine von DRG-Zellen transportiert wurde, scheint der für die Endozytose verantwortliche Rezeptoranteil bei diesen Zellen zu fehlen bzw. nicht an der Zelloberfläche zu erscheinen. Vorstellbar wäre, dass sich die Toxine / Fragmente an der Zelloberfläche sowohl der DRG- als auch der SC-

Neurone an ubiquitäre Ganglioside anlagern. Lediglich die SC-Neurone exprimieren u.U. jedoch das Rezeptorprotein, welches eine endozytotische Aufnahme des Toxins bzw. Fragments ermöglicht. Dieses würde mit den Befunden von Matteoli (Matteoli et al. 1996) übereinstimmen, nach denen Endozytose für die Toxinaufnahme essentiell ist, denn der periphere Teil der DRG-Zellen setzt keine Transmitter frei.

#### 5.4 Eingrenzung der relevanten Domänen

Wie bereits ausgeführt, werden den drei abgrenzbaren Domänen (LC, H<sub>N</sub> und H<sub>C</sub>) unterschiedliche Funktionen zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit werden nur die Funktionen der beiden Fragmente der schweren Kette (H<sub>N</sub> und H<sub>C</sub>) untersucht, da sie für Bindung und Transport des Toxins verantwortlich sind.

Bindungsstudien mit BoNT/A haben gezeigt, dass die 30 AS des C-Terminus von HC eine Affinität zu GT1b-Gangliosiden haben (Shone et al. 1985). Für TeNT wurde gezeigt, dass die gangliosid-bindende Domäne im Bereich der C-terminalen 34 Aminosäuren (AS 1110-1315) von HC bzw. H<sub>C</sub> lokalisiert ist (Shapiro et al. 1997). Diese Subdomäne befindet sich bei BoNT/A und bei TeNT in einer Schleife, die auch beim Holotoxin von außen zugänglich ist (Lacy et al. 1998). Es könnte sich bei dieser Region um den gangliosid-bindenden Bereich aller Clostridientoxine handeln.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte am Beispiel des TeNT eine Bindung an DRG- und SC-Neurone mit nativem, chemisch fluoreszenzmarkiertem Toxin und mit verschiedenen rekombinanten, ebenfalls chemisch fluoreszenz- oder GFP-markierten Fragmenten gezeigt werden.

Es binden alle untersuchten Fragmenten, die den C-Terminus der schweren Kette beinhalten, und mindestens 205 (bei chemischer Markierung) bzw. 450 (bei Konjugation an GFP) Aminosäuren der nativen TeNT-Sequenz enthalten. Zusätzliche tags (Strep-II® bzw. His-6) stören nicht, auch wenn die Konjugation an den C-Terminus erfolgte (siehe 4.1 bis 4.2.4, 4.2.6, 4.2.1 bis 4.2.6 und 4.3.1 bis 4.3.3).

In Bindungsstudien von Shone (mit BoNT/A, Shone et al. 1985) und Lacy (mit TeNT, Lacy et al. 1998) wurde die Bindung eines Fragmentes der 34 C-terminalen AS an Gangliosiden nachgewiesen. In dem hier verwendeten Zellkultursystem

konnte die Bindung des Fragmentes der C-terminalen 34 AS von HC (fluoreszenzmarkiert mit Alexa®488 bzw. GFP) nicht nachgewiesen werden.

Es lässt sich an dieser Stelle nicht abschätzen, ob das Fragment selbst nicht bindet, oder ob die Fluoreszenzmarkierungen die Bindung stört. Im Fall des GFP-markierten Fragmentes erscheint es wahrscheinlich, dass das verhältnismäßig große Markierungsprotein eine Bindung sterisch verhindert. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Experimenten unter 4.3.3 und 4.3.4 mit dem Fragment der C-terminalen 205 AS von HC, bei denen sich eine Bindung des chemisch markierten Fragmentes nachweisen ließ (s. 4.3.3), sich aber keine Bindung bei dem GFP-markierten Fragment zeigte (s. 4.3.4), ist ein störender Einfluss der Markierung wahrscheinlich. Die dargestellten Ergebnisse sind mit den Arbeiten von Shone und Lacy folglich auf dem Hintergrund möglicher störender Einflüsse der Markierung zu vergleichen und zeigen damit auch eine Grenze der hier verwendeten Markierungsmethoden auf. Ähnliche methodische Probleme ergaben sich auch bei den experimentellen Verfahren von Kamata (Kamata et al. 1997), bei dem die Veränderung der Fluoreszenz des in den Toxinfragmenten enthaltenen Tryptophans als Messparameter genutzt wurde. Bei kleinen Fragmenten ist jedoch keine ausreichende Anzahl von Tryptophan-Molekülen enthalten, so dass in diesem Fall die Messung erschwert ist (Lacy et al. 1998).

Das GFP-markierte rekombinante H<sub>C</sub><sub>1110-1315</sub>TeNT-S (205 AS) bindet zwar noch nach chemischer Fluoreszenzmarkierung (Alexa®488), aber nicht als GFP-Konjugat mit GFP am N-Terminus (siehe 4.3.3 und 4.3.4) an neuronale Zellen. Offensichtlich wirkt sich bei diesem Konstrukt der Einfluss des chemischen Fluorophors (0,643 kD) nicht störend auf die Bindung aus, während der proteinogenen Fluorophors (ca. 26 kD) die Bindung verhindert. Ob der Effekt rein sterische Gründe hat (Distanz zwischen Rezeptor und Toxinfragment nach Konjugation zu groß) oder auch durch eine veränderte Funktionalität am Toxinfragment hervorgerufen wird (zusätzliche funktionelle Gruppen durch angehängtes GFP), ist nicht differenzierbar.

Es gibt bisher keine experimentellen Befunde bezüglich möglicher Bindungsdomänen in H<sub>C</sub> (Lacy und Stevens 1999), außer zu dem bereits beschriebenen Fragment der C-terminalen 34 AS. Da das gesamte Fragment H<sub>C</sub> 450 AS umfasst (H<sub>C</sub><sub>(865-1315)</sub>), lagen zu einer 416 AS umfassenden Sequenz noch keine experimentellen Daten vor. Die oben dargestellten Experimente mit H<sub>C</sub><sub>(865-1315)</sub> bzw.

$H_C$  (1110-1315) sind die ersten Untersuchungen mit Fragmenten, in denen die für die Endozytose verantwortliche Proteinbindungsdomäne vermutet wird. Diese Vermutung lässt sich bestätigen, markiertes  $H_C$  (865-1315) wurde gebunden und transportiert. Da das 205 AS umfassende  $H_C$  (1110-1315) nach Fluoreszenzmarkierung mit Alexa®488 auch gebunden und transportiert wurde, lässt sich die Lage der Proteinbindungsdomäne weiter einschränken: Sie muss im Bereich der 205 C-terminalen AS lokalisiert sein.

Die dargestellten Ergebnisse machen auch deutlich, dass die weitere Eingrenzung der verantwortlichen AS mit der Hilfe eines nachträglich zu verwendenden chemischen Fluorophors durchgeführt werden kann, da das GFP an sich einen offenbar erheblichen Einfluss auf das Verhalten der zu testenden Konstrukte nimmt, wenn diese eine Mindestgröße (hier am Beispiel des 205 AS Fragmentes gezeigt) unterschreiten.

In Übereinstimmung mit allen bisherigen Literaturangaben (Critchley et al. 1988; Kamata et al. 1997; Shapiro et al. 1997; Lacy et al. 1998; Lacy und Stevens 1999; Schiavo et al. 2000; Bigalke und Shoer 2000) hat kein Konstrukt, das nicht den C-terminalen Bereich (205 AS bei chemischer Fluoreszenzmarkierung) enthält, an die DRG- oder SC-Neurone gebunden (siehe 4.3.7 bis 4.3.11) bzw. wurde transportiert.

Für das N-terminale Fragment ( $H_N$ ) der schweren Kette wurden Subdomänen (AS 659-681, gezeigt für BoNT/A) mit porenformende Eigenschaften für Lipidmembranen beschrieben (Oblatt-Montal et al. 1995). Röntgenstrukturanalytische Daten zu Folge ist besonders ein Paar von 105 Å-langen  $\alpha$ -Helices auffällig, die bei BoNT/A dem Bereich der AS 685-827 entsprechen. Virale Proteine mit vergleichbaren Domänen verändern ebenfalls pH-abhängig ihre Struktur und penetrieren Membranen, sie sind jedoch nicht zur Translokation fähig (Lacy et al. 1998). Ein Zusammenhang dieser Domänen der Clostridientoxinen mit der Translokation wird auf der Basis von Berechnungen zur Elektronendichteverteilung (MOMENT Algorithmus zur Beschreibung hydrophober Bereiche, AS 595-614, 625-647 und 648-691 bei BoNT/A, Lebeda und Olson 1995; Lacy und Stevens 1999) angenommen, ist experimentell jedoch nicht bestätigt.

Die in der Einleitung formulierten Aufgabestellungen der vorliegenden Arbeit konnten zusammenfassend wie folgt gelöst werden:

Es wurde ein *in vitro* – Zellkultursystem auf der Basis des 3-Kammer-Zellkultursystems von Campenot und Sonderegger (Campenot 1982a, b; Sonderegger et al. 1983) zur Untersuchung des axonalen Transportes von TeNT etabliert, mit dessen Hilfe zwischen Bindung und Transport in neuronaler Zellkultur unterschieden werden konnte. Dabei konnte durch den Einsatz von unterschiedlichen neuronalen Zellkulturen (DRG- bzw. gemischte SC-Zellen) eine eindeutige Abhängigkeit des intrazellulären Transportes vom verwendeten Zelltyp nachgewiesen werden.

Die für Bindung und Transport von TeNT verantwortlichen Domänen konnten dahingehend eingegrenzt werden, dass sie sich im Bereich der 205 C-terminalen AS der schweren Kette befinden müssen. Literaturangaben, die eine gangliosid-affine Struktur im Bereich der C-terminalen 34 AS beschreiben, ließen sich experimentell nicht bestätigen, ein störender Einfluss der verwendeten Markierung auf die Bindungseigenschaften kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. Die gefundenen Ergebnisse sprechen gegen rezeptoraffine Sequenzen im Bereich des N-Terminus von TeNT, LH<sub>N</sub>, H<sub>N</sub> oder H<sub>C</sub>N – es war keine Bindung von entsprechenden Fragmenten zu beobachten.

## 5.5 Ausblick

Die Möglichkeit einer Fluoreszenzmarkierung unter Beibehaltung der Zell-Bindung, -Aufnahme und des intrazellulären Transportes lässt vermuten, dass die Konjugation eines Fragments des Tetanustoxins mit einer pharmakologischen Wirkkomponente möglich sein wird. Diese Wirkkomponente ließe sich nach Konjugation mit der Bindungs- und Transport-Domäne des TeNT oder anderer Clostridientoxine in neuronale Zellen einzuschleusen. Als deutlicher Hinweis lässt sich das positive Ergebnis mit Alexa®488-markiertem H<sub>C(1110-1315)</sub>TeNT-S und mit GFP-markiertem H<sub>C</sub> werten.

Durch Änderungen an der Auswerteeinheit (z.B. Einsatz einer Videokamera in Kombination mit einem gasdichten Objektbereich am Fluoreszenzmikroskop)

könnten die Ergebnisse quantifiziert werden. Die Beeinflussung einer Mutation oder einer Konjugation wäre dann mit einem Standard vergleichbar.

Diese Präzisierung des experimentellen Befundes wäre vor allem bei der Entwicklung und Testung von klinisch-pharmakologisch anwendbaren Konjugaten interessant.

Die weiterführende Frage nach der Freisetzung der Substanzen aus dem endozytotischen Vesikel innerhalb des Neurons erfordert weiterführende Experimente. In der vorliegenden Form ermöglicht es der Versuchsaufbau nicht, zu kontrollieren, ob gebundenes und transportiertes Toxin bzw. Fragment das Vesikel (z.B. nach Bildung einer Pore nach intravesikulärer Ansäuerung) verlässt. Die Kombination von Experimenten mit dem 3-Kammer-System und Toxizitätstests würde Aussagen zu dieser weiterführenden Fragestellung ermöglichen.

Matthias Meder

## 6. Literatur

Adams F (1849) The genuine works of Hippocrates, Vol. 2, London, The Sydenham Society, 737 ff

Adams F (1856) The extant works of Aretaeus, the Cappadocian, London, The Sydenham Society, 253 ff

Ahnert-Hilger G, Weller U, Dauzenroth ME, Habermann E, Gratzl M (1989a) The tetanus toxin light chain inhibits exocytosis. *FEBS Lett* 242: 245-248

Ahnert-Hilger G, Bader MF, Bhakdi S, Gratzl M (1989b) Introduction of macromolecules into bovine adrenal medullary chromaffin cells and rat pheochromocytoma cells (PC12) by permeabilization with streptolysin O: inhibitory effect of tetanus toxin on catecholamine secretion. *J Neurochem* 52: 1751-1758

Ahnert-Hilger G, Weller U (1993) Comparison of the intracellular effects of clostridial neurotoxins on exocytosis from streptolysin O-permeabilized rat pheochromocytoma (PC 12) and bovine adrenal chromaffin cells. *Neuroscience* 53: 547-552

Ambache N, Lippold OCH (1949) Bradicardia of central origin produced by injections of tetanus toxin into the vagus nerve. *J Physiol (Lond)* 108: 186-196

Amon SS (1980) Infant botulism. *Annu Rev Med* 31: 541-560

Banerjee A, Kowalchuk JA, DasGupta BR, Martin TFJ (1996) SNAP-25 is Required for a Late Postdocking Step in  $Ca^{2+}$ -Dependent Exocytosis. *J Biol Chem* 271(N34): 20227-20230

Bartels F, Bigalke H (1992) Restoration of exocytosis occurs after inactivation of intracellular tetanus toxin. *Infect Immun* 60: 302-307

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (1996) *Neuroscience*, Williams and Wilkins

Beise J, Hahnen J, Andersen Beckh B, Dreyer F (1994) Pore formation by tetanus toxin, its chain and fragments in neuronal membranes and evaluation of the underlying motifs in the structure of the toxin molecule. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 349: 66-73

Bell S, (1824) *Observations on injuries of the spine and of the thigh bone*, London, Tegg

Bennett MK, Calakos N, Scheller RH (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257: 255-259

Bergey GK, Bigalke H, Nelson PG (1987) Differential effects of tetanus toxin on inhibitory and excitatory synaptic transmission in mammalian spinal cord neurons in culture: A presynaptic locus of action for tetanus toxin. *Journal of Physiology* 57: 121-131

- Bigalke H, Heller I, Bizzini B, Habermann E (1981) Tetanus toxin and botulinum A toxin inhibit release and uptake of various transmitters, as studied with particulate preparations from rat brain and spinal cord. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 316: 244-251
- Bigalke H, Muller H, Dreyer F (1986) Botulinum A neurotoxin unlike tetanus toxin acts via a neuraminidase sensitive structure. *Toxicon* 24: 1065-1074
- Bigalke H, Binscheck T, Bartels F (1996) Transmembrane voltage and pH gradients facilitate the translocation of tetanus toxin through membranes devoid of receptors. *Toxicon* 34: 294.
- Bigalke H, Shoer L (2000) Clostridial Neurotoxins. In Aktories K, Just I, (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 145, Bacterial Protein Toxins, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 407-443
- Binz T, Kurazono H, Wille M, Frevert J, Wernars K, Niemann H (1990) The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins. *J Biol Chem* 265: 9153-9158
- Bittner MA, DasGupta BR, Holz RW (1989) Isolated light chains of botulinum neurotoxins inhibit exocytosis. Studies in digitonin-permeabilized chromaffin cells. *J Biol Chem* 264: 10354-10360
- Black JD, Dolly JO (1986a) Interaction of 125I-labelled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. *J Cell Biol* 103: 521-534
- Black JD, Dolly JO (1986b) Interaction of 125I-labelled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 103: 535-544
- Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, Südhof TC, Niemann H, Jahn R (1993a) Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25 [see comments]. *Nature* 365: 160-163
- Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R (1993b) Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J* 12: 4821-4828
- Boquet P, Duflot E, Hauttecoeur B (1984) Low pH induces a hydrophobic domain in tetanus toxin. *Eur J Biochem* 144: 339-344
- Burningham MD, Walter FG, Mechem C, Haber J, Ekins BR (1994) Wound botulism. *Ann Emerg Med* 24: 1184-1187
- Calakos N, Scheller RH (1996) Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description. *Physiol Rev* 76: 1-29
- Campanot RB (1982a) Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. I. Local control of neurite growth by nerve growth factor. *Dev Biol* 93(1): 1-12



- Campenot RB (1982b) Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II. Local control of neurite survival by nerve growth factor. *Dev Biol* 93(1): 13-21
- Campenot RB (1987) Local control of neurite sprouting in cultured sympathetic neurons by nerve growth factor. *Brain Res* 465(1-2): 293-301
- Campenot RB (1994) NGF and the local control of nerve terminal growth. *J Neurobiol* 25(6): 599-611
- Chapman ER, Hanson PI, An S, Jahn R (1995)  $Ca^{2+}$  regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* 270: 23667-23671
- Critchley DR, Parton RG, Davison MD, Pierce EJ (1988) Characterization of tetanus toxin binding by neuronal tissue. In J.O. Dolly (Ed.), *Neurotoxins in neurochemistry*, London, Wiley and Sons, 109-122
- Dagert M, Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*. 6(1): 23-8
- Dayanithi G, Ahnert Hilger G, Weller U, Nordmann JJ, Gratzl M (1990) Release of vasopressin from isolated permeabilized neurosecretory nerve terminals is blocked by the light chain of botulinum A toxin. *Neuroscience* 39: 711-715
- Dayanithi G, Weller U, Ahnert Hilger G, Link H, Nordmann JJ, Gratzl M (1992) The light chain of tetanus toxin inhibits calcium-dependent vasopressin release from permeabilized nerve endings. *Neuroscience* 46: 489-493
- de Chaves EI, Rusinol AE, Vance DE, Campenot RB, Vance JE (1997) Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. *J Biol Chem* 272(49): 30766-30773
- de Paiva A, Dolly JO (1990) Light chain of botulinum neurotoxin is active in mammalian motor nerve terminals when delivered via liposomes. *FEBS Lett* 277: 171-174
- Dimpfel W, Neale JH, Habermann E (1975)  $^{125}I$ -Labelled tetanus toxin as a neuronal marker in tissue cultures derived from embryonic CNS. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 290: 329-333
- Dimpfel W, Huang RTC, Habermann E (1977) Gangliosides in nerve tissue cultures and binding of  $^{125}I$ -labelled tetanus toxin, a neuronal marker. *J Neurochem* 29: 329-334
- Dolly JO, Black JD, Williams RS, Melling J (1984) Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature* 307: 457-460
- Dreyer F (1989) Peripheral actions of tetanus toxin. In L.L. Simpson (Ed.), *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*, Academic Press, Inc., 179-197
- Eisenbarth GS, Oie H, Gazdar A, Chick W, Schultz JA, Searce RM (1981) Production of monoclonal antibodies reacting with rat islet cell membrane antigens. *Diabetes* 30: 226-230

- Emsley P, Fotinou C, Black I, Fairweather NF, Charles IG, Watts C, Hewitt E, Isaacs NW (2000) The structure of the HC fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J of Bio Chem* 275 (12): 8889-8894
- Erdal E, Bartels F, Binscheck T, Erdmann G, Frevert J, Kistner A, Weller U, Wever J, Bigalke H (1995) Processing of tetanus and botulinum A neurotoxins in isolated chromaffin cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 351: 67-78
- Erdmann G, Hanauske A, Wellhoner HH (1981) Intraspinal distribution and reaction in the grey matter with tetanus toxin of intracisternally injected anti-tetanus toxoid F(ab')<sub>2</sub> fragments. *Brain Res* 211: 367-377
- Fairweather NF, Lyness VA (1986) The complete nucleotide sequence of tetanus toxin. *Nucleic Acids Res* 14: 7809-7812
- Gaisano HY, Sheu L, Foskett JK, Trimble WS (1994) Tetanus toxin light chain cleaves a vesicle-associated membrane protein (VAMP) isoform 2 in rat pancreatic zymogen granules and inhibits enzyme secretion. *J Biol Chem* 269: 17062-17066
- Galli T, Zahraoui A, Vaidyanathan VV, Raposo G, Tian JM, Karin M, Niemann H, Louvard D (1998) A novel tetanus neurotoxin insensitive vesicle associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 9(6): 1437-1448
- Gambale F, Montal M (1988) Characterization of the channel properties of tetanus toxin in planar lipid bilayers. *Biophys J* 53: 771-783
- Habermann E, Heller I (1975) Direct evidence for the specific fixation of Cl. botulinum A neurotoxin to brain matter. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 287: 9
- Habermann E, Albus U (1986) Interaction between tetanus toxin and rabbit kidney: a comparison with rat brain preparations. *J Neurochem* 46: 1219-1226
- Habermann E, Weller U, Hudel M (1991) Limited proteolysis of single-chain tetanus toxin by tissue enzymes, in cultured brain tissue and during retrograde axonal transport to the spinal cord. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343: 323-329
- Habig WH, Bigalke H, Bergey GK, Neale EA, Hardegree MC, Nelson PG (1986) Tetanus toxin in dissociated spinal cord cultures: Long-term characterization of form and action. *Journal of Neurochemistry* 47: 930-937
- Hagenah R, Benecke R, Wiegand H (1977) Effects of Type Botulinum Toxin on the Cholinergic Transmission at Spinal Renshaw Cells and on the Inhibitory Action at Ia Inhibitory Interneurons. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 299: 267-272
- Halpern JL, Neale EA (1995) Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Curr Top Microbiol Immunol* 195: 221-241
- Hanson PI, Heuser JE, Jahn R (1997) Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr Opin Neurobiol* 7: 310-315

- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Sudhof TC, Niemann H (1994) Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J* 13: 5051-5061
- Hensel B, Seib UC, Wellhoner HH (1973) Vagal ascent and distribution of 125 I-tetanus toxin after injection into the anterior wall of the stomach. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 276: 395-402
- Herreros J, Lalli G, Montecuccio C, Schiavo G (2000) Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J Neurochem* 74: 1941-1950
- Herreros J, Lalli G, Schiavo G (2000) C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor *Biochem J* 347: 199-204
- Ho TC, Del Priore LV, Kaplan HJ (1977) Tissue culture of retinal pigment epithelium following isolation with a gelatin matrix technique. *Exp Eye Res* 64:
- Hoch DH, Romera-Mira M, Ehrlich BE, Finkelstein A, DasGupta BR, Simpson LL (1985) Channels formed by botulinum, tetanus and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc Natl Acad Sci* 82: 1692-1696
- Holmgren J, Elwing H, Fredman P, Svennerholm L (1980) Polystyrene-adsorbed gangliosides for investigations of the tetanus and cholera toxin receptor. *Eur J Biochem* 106: 371-379
- Hua SY, Raciborska DA, Trimble WS, Charlton MP (1998) Different VAMP/synaptobrevin complexes for spontaneous and evoked transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 80(6): 3233-3246
- Hua SY, Charlton MP (1999) Activity-dependent changes in partial VAMP complexes during neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 2(12): 1078-1083
- Kaiser C, Ferro Novick S (1998) Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *Curr Opin Cell Biol* 10: 477-482
- Kamata Y, Yoshimoto M, Kozaki S (1997) Interaction between botulinum neurotoxin type A and ganglioside: ganglioside inactivates the neurotoxin and quenches its tryptophan fluorescence. *Toxicon* 35:1337-1340
- Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (1998) *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme Verlag Stuttgart New York
- Kerner, J (1820) Neue Beobachtungen über die in Württemberg so häufig vorkommenden tödlichen Vergiftungen durch den Genuss geräucherter Würste, Tübingen, Osiander, 1820, 120 ff
- Kerner, J (1822) Das Fettgift oder die Fettsäure und ihre Wirkungen auf den thierischen Organismus, ein Beytrag zur Untersuchung des in verdorbenen Würsten giftig wirkenden Stoffes, Stuttgart und Tübingen, Cotta, 1822, 368 ff

Kimpinski K, Campenot RB, Mearow K (1997) Effects of the neurotrophins nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on neurite growth from adult sensory neurons in compartmented cultures. *J Neurobiol* 33(4): 395-410

Kistner A, Habermann E (1992) Reductive cleavage of tetanus toxin and botulinum neurotoxin A by the thioredoxin system from brain. Evidence for two redox isomers of tetanus toxin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345: 227-234

Kitamura M (1976) Binding of botulinum neurotoxin to the synaptosome fraction of rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 295: 171-175

Kozaki S, Kamata Y, Watarai S, Nishiki T, Mochida S (1998) Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for Clostridium botulinum neurotoxins. *Microb Pathog* 25: 91-99

Kuhn TB, Stoeckli ET, Condrau MA, Rathjen FG, Sonderegger P (1991) Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol* 115(4): 1113-1126

Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC (1998) Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* 5: 898-902

Lacy DB, Stevens RC (1999) Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol* 291(5): 1091-1104

Land J, Zhang H, Vaidyanathan VV, Sadoul K, Niemann H, Wollheim CB (1997) Transient expression of botulinum neurotoxin C1 light chain differentially inhibits calcium and glucose induced insulin secretion in clonal beta-cells. *FEBS Lett* 419: 13-17

Lebeda FJ, Olson MA (1995) Structural predictions of the channel-forming region of botulinum neurotoxin heavy chain. *Toxicon* 33: 559-567

Ledley FD, Lee G, Kohn LD, Habig WH, Hardegree MC (1977) Tetanus toxin interactions with thyroid plasma membranes. Implications for structure and function of tetanus toxin receptors and potential pathophysiological significance. *J Biol Chem* 252: 4049-4055

Link E, Edelmann L, Chou JH, Binz T, Yamasaki S, Eisel U, Baumert M, Südhof TC, Niemann H, Jahn R (1992) Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 1017-1023

Martin TFJ (1997) Stages of regulated exocytosis. *Trends Cell Biol* 7: 271-276

Marxen P, Bigalke H (1989) Tetanus toxin: inhibitory action in chromaffin cells is initiated by specified types of gangliosides and promoted in low ionic strength solution. *Neurosci Lett* 107: 261-266

Marxen P, Fuhrmann U, Bigalke H (1989) Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum A neurotoxins on exocytosis in chromaffin cells. *Toxicon* 27: 849-859

- Marxen P, Bartels F, Ahnert HG, Bigalke H (1991) Distinct targets for tetanus and botulinum A neurotoxins within the signal transducing pathway in chromaffin cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344: 387-395
- Matteoli M, Verderio C, Rossetto O, Iezzi N, Coco S, Schiavo G, Montecucco C (1996) Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13310-13315
- Menestrina G, Forti S, Gambale F (1989) Interaction of tetanus toxin with lipid vesicles. Effects of pH, surface charge, and transmembrane potential on the kinetics of channel formation. *Biophys J* 55: 393-405
- Montecucco C (1986) How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes?. *Trends in Biochem* 11: 314-317
- Montecucco C, Schiavo G, DasGupta BR (1989) Effect of pH on the interaction of botulinum neurotoxins A, B and E with liposomes. *Biochem J* 259: 47-53
- Montecucco C, Schiavo G (1995) Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys* 28: 423-472
- Montesano R, Roth J, Robert A, Orci L (1982) Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxin. *Nature* 296: 651-653
- Morino P, Buchstaller A, Giger R, Sonderegger P, Rager G (1996) Differential expression of the mRNAs of the axonal glycoproteins axonin-1 and NgCAM in the developing chick retina. *Brain Res* 91(2): 252-259
- Mostov K (1993) Protein traffic in polarized epithelial cells: the polymeric immunoglobulin receptor as a model system. [Review] *J Cell Sci Suppl* 17: 21-26
- Niemann H (1991) Molecular biology of clostridial neurotoxins. In J.E. Alouf and J.H. Freer (Eds.), *Sourcebook of bacterial protein toxins*, Academic Press, 303-348
- Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, Omori A, Ito T, Takahashi M, Kozaki S (1994) Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 269: 10498-10503
- Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sekiguchi M, Takahashi M, Kozaki S (1996) Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA. *Neurosci Lett* 208: 105-108
- Nunn JF (1996) *Ancient egyptian medicine*, British Museum Press, 181 ff
- Oblatt-Montal M, Yamazaki M, Nelson R, Montal M (1995) Formation of ion channels in lipid bilayers by a peptide with the predicted transmembrane sequence of botulinum neurotoxin A. *Protein Sci* 4(8):1490-1497
- Ochanda JO, Syuto B, Ohishi I, Naiki M, Kubo S (1986) Binding of *Clostridium botulinum* neurotoxin to gangliosides. *J Biochem Tokyo* 100: 27-33
- Osborne R, Bradford H (1973) Tetanus toxin inhibits amino acid release from nerve endings in vitro. *Nature New Biology* 244: 157-158

- Parton RG, Ockleford CD, Critchley DR (1987) A Study of the Mechanism of Internalisation of Tetanus Toxin by Primary Mouse Spinal Cord Cultures. *J Neurochem* 49: 1057-1068
- Parton RG, Ockleford CD, Critchley DR (1988) Tetanus toxin binding to mouse spinal cord cells: an evaluation of the role of gangliosides in toxin internalization. *Brain Res* 475: 118-127
- Pierce EJ, Davison MD, Parton RG, Habig HW, Critchley DR (1986) Characterization of tetanus toxin binding to rat brain membranes. *Biochem J* 236: 845-852
- Rauch G, Gambale F, Montal M (1990) Tetanus toxin channel in phosphatidylserine planar bilayers: conductance states and pH dependence. *Eur Biophys J* 18: 79-83
- Rethy L, Rethy LA (1997) Human lethal dose of tetanus toxin [letter]. *Lancet* 350: 1518
- Roa M, Boquet P (1985) Interaction of Tetanus Toxin with Lipid Vesicles at Low pH. *J Biol Chem* 260, No. 11: 6827-6835
- Rothman JE, Wieland FT (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272: 227-234
- Sadoul K, Lang J, Montecucco C, Weller U, Regazzi R, Catsicas S, Wollheim CB, Halban PA (1995) SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release. *J Cell Biol* 128: 1019-1028
- Sathyamoorthy V, DasGupta BR (1985) Separation, purification, partial characterization and comparison of the heavy and light chains of botulinum neurotoxins types A, B, and E. *Biol Chem* 260: 10461-10466
- Savoca R, Ziegler U, Sonderegger P (1995) Effects of L-serine on neurons in vitro. *J Neurosci Methods* 61(1-2): 159-167
- Scheller RH (1995) Membrane trafficking in the presynaptic nerve terminal. *Neuron* 14: 893-897
- Schiavo G, Demel R, Montecucco C (1991) On the role of polysialoglycosphingolipids as tetanus toxin receptors. A study with lipid monolayers. *Eur J Biochem* 199: 705-711
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C (1992a) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin [see comments]. *Nature* 359: 832-835
- Schiavo G, Poulain B, Rossetto O, Benfenati F, Tauc L, Montecucco C (1992b) Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. *EMBO J* 11: 3577-3583
- Schiavo G, Rossetto O, Santucci A, DasGupta BR, Montecucco C (1992c) Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J Biol Chem* 267: 23479-23483

- Schiavo G, Rossetto O, Catsicas S, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Benfenati F, Montecucco C (1993a) Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *J Biol Chem* 268: 23784-23787
- Schiavo G, Santucci A, DasGupta BR, Mehta PP, Jontes J, Benfenati F, Wilson MC, Montecucco C (1993b) Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett* 335: 99-103
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C (2000) Neurotoxins affecting neurocytosis. *Physiol Reviews* 80 (2): 717-766
- Schmid MF, Robinson JP, DasGupta BR (1993) Direct visualization of botulinum neurotoxin-induced channels in phospholipid vesicles. *Nature* 364: 827-830
- Schmitt A, Dreyer F, John C (1981) At least three sequential steps are involved in the tetanus toxin-induced block of neuromuscular transmission. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 317: 326-330
- Schwab ME, Thoenen H (1976) Electron microscopic evidence for transsynaptic migration of tetanus toxin in spinal cord motoneurons: an autoradiographic and morphometric study. *Brain Res* 105: 213-227
- Schwab ME, Thoenen H (1977) Selective trans-synaptic migration of tetanus toxin after retrograde axonal transport in peripheral sympathetic nerves: a comparison with nerve growth factor. *Brain Res* 122: 459-474
- Schwab ME, Suda K, Thoenen H (1979) Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport. *J Cell Biol* 82: 798-810
- Senger DL, Campenot RB (1997) Rapid retrograde tyrosine phosphorylation of trkA and other proteins in rat sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Cell Biol* 138(2): 411-421
- Shapiro RE, Specht CD, Collins BE, Woods AS, Cotter RJ, Schnaar RL (1997) Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel gangliosides photoaffinity ligand. *J Biol Chem* 272 (N48): 30380-30386
- Sheridan RE (1998) Gating and permeability of ion channels produced by botulinum toxin types A and E in PC12 cell membranes. *Toxicon* 36: 703-717
- Shone CC, Hambleton P, Melling J (1985) Inactivation of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin by trypsin and purification of two tryptic fragments. Proteolytic action near the COOH-terminus of the heavy subunit destroys toxin-binding activity. *Eur J Biochem* 151(1):75-82
- Simpson LL, Rapport MM (1971) Ganglioside inactivation of botulinum toxin. *Journal of Neurochemistry* 18: 1341-1343
- Simpson LL (1980) Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin A and the cholinergic neuromuscular junction. *J Pharmacol Exp Ther* 212: 16-21
- Simpson LL (1989) Peripheral actions of botulinum toxins. In L.L. Simpson (Ed.), *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*, Academic Press, Inc., 153-173

- Simpson LL, Coffield JA, Bakry N (1994) Inhibition of vacuolar adenosine triphosphatase antagonizes the effects of clostridial neurotoxins but not phospholipase A2 neurotoxins. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 256-262
- Sloop RR, Cole BA, Escutin RO (1997) Human response to botulinum toxin injection - type-B compared with type-A. *Neurology* 49 (N1): 189-194
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324
- Sonderegger P, Fishman MC, Bokoum M, Bauer HC, Nelson PG (1983) Axonal proteins of presynaptic neurons during synaptogenesis. *Science* 221(4617): 1294-1297
- Stecher B, Gratzl M, Ahnert-Hilger G (1989a) Reductive chain separation of botulinum A toxin--a prerequisite to its inhibitory action on exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett* 248: 23-27
- Stecher B, Weller U, Habermann E, Gratzl M, Ahnert-Hilger G (1989b) The light chain but not the heavy chain of botulinum A toxin inhibits exocytosis from permeabilized adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett* 255: 391-394
- Stoeckli ET, Lemkin PF, Kuhn TB, Ruegg MA, Heller M, Sonderegger P (1989) Identification of proteins secreted from axons of embryonic dorsal-root-ganglia neurons. *Eur J Biochem* 180(2): 249-258
- Stoeckli ET, Ziegler U, Bleiker AJ, Groscurth P, Sonderegger P (1996) Clustering and functional cooperation of Ng-CAM and axonin-1 in the substratum-contact area of growth cones. *Dev Biol* 177(1): 15-29
- Südhof TC, DeCamilli P, Niemann H, Jahn R (1993) Membrane fusion machinery: Insights from synaptic proteins. *Cell* 75: 1-4
- Südhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653
- Sun KO, Chan YW, Cheung RT, So PC, Yu YL, Li PC (1994) Management of tetanus: a review of 18 cases [see comments]. *J R Soc Med* 87: 135-137
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution [see comments]. *Nature* 395: 347-353
- Umland TC, Wingert LM, Swaminathan S, Furey WF, Schmidt JJ, Sax M (1997) Structure of the receptor binding fragment H-C of tetanus neurotoxin. 4 (N10) 788: 792
- Ure DR, Campenot RB (1997) Retrograde transport and steady-state distribution of 125I-nerve growth factor in rat sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Neurosci* 17(4): 1282-1290



- Vaidyanathan VV, Yoshino K, Jahnz M, Dorries C, Bade S, Nauenburg S, Niemann H, Binz T (1999) Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *J Neurochem* 72: 327-337
- van Heyningen WE, Mellanby J (1973) A note on the specific fixation, specific deactivation and nonspecific inactivation of bacterial toxins by gangliosides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 276: 297-302
- van Heyningen WE, Miller PA (1961) The fixation of tetanus toxin by gangliosides. *J Gen Microbiol* 24: 107-119
- Vance JE, Pan D, Vance DE, Campenot RB (1991) Biosynthesis of membrane lipids in rat axons. *J Cell Biol* 115(4): 1061-1068
- Verderio C, Coco S, Rossetto O, Montecucco C, Matteoli M (1999) Internalization and proteolytic action of botulinum toxins in CNS neurons and astrocytes. *J Neurochem* 73(1): 372-379
- Vesterberg O, Svenson H (1966) Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH-gradients. *Acta Chem Scand* 20:
- Wadsworth JDF, Desai M, Tranter HS, King HJ, Hambleton P, Melling J, Dolly JO, Shone CC (1990) Botulinum type F neurotoxin. Large-scale purification and characterization of its binding to rat cerebrocortical synaptosomes. *Biochem J* 268: 123-128
- Warren G, Malhotra V (1998) The organisation of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 10: 493-498
- Watanabe M, Fukuda, Y (1997) Proportions of ON-center versus OFF-center Cells in retinal ganglion cells with regenerated axons of adult cats. *Exp Neurol* 143:
- Weller U, Taylor CF, Habermann E (1986) Quantitative comparison between tetanus toxin, some fragments and toxoid for binding and axonal transport in the rat. *Toxicon* 24: 1055-1063
- Weller U, Mauler F, Habermann E (1988) Tetanus toxin: biochemical and pharmacological comparison between its protoxin and some isotoxins obtained by limited proteolysis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 338: 99-106
- Weller U, Dauzenroth ME, Meyer zu Heringdorf D, Habermann E (1989) Chains and fragments of tetanus toxin. Separation, reassociation and pharmacological properties. *Eur J Biochem* 182: 649-656
- Weller U, Dauzenroth ME, Gansel M, Dreyer F (1991) Cooperative action of the light chain of tetanus toxin and the heavy chain of botulinum toxin type A on the transmitter release of mammalian motor endplates. *Neurosci Lett* 122: 132-134
- Wellhöner HH, Neville DMJ (1987) Tetanus toxin binds with high affinity to neuroblastoma x glioma hybrid cells ND-108-15 and impairs their stimulated acetylcholine release. *Journal of Biological Chemistry* 262: 17374-17378

Wendland B, Emr SD, Riezman H (1998) Protein traffic in the yeast endocytic and vacuolar protein sorting pathways. *Curr Opin Cell Biol* 10: 513-522

Wernig A, Stover H, Tonge D (1977) The labelling of motor endplates in skeletal muscle of mice with 125I-tetanus toxin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 298: 37-42

Wiegand H, Erdmann G, Wellhöner HH (1976) 125I-labeled botulinum A neurotoxin: Pharmacokinetics in cats after intramuscular injection. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 292: 161-165

Wiegandt, H., (1985) *Glycolipids*, Amsterdam, Elsevier Science Publisher

Williams RS, Tse CK, Dolly JO, Hambleton P, Melling J (1983) Radioiodination of botulinum neurotoxin type A with retention of biological activity and its binding to brain synaptosomes. *Eur J Biochem* 131: 437-445

Yavin E, Lazarovici P, Nathan A (1987) Molecular interactions of ganglioside receptors with tetanotoxin on solid supporters, aqueous solutions and natural membranes. In K.A.W. Wirtz (Ed.), *Membrane Receptors, Dynamics, and Energetics*, Plenum Press, 135-137

# Lebenslauf

Name: **Matthias Meder**  
Email: meder.matthias@mh-hannover.de  
  
Geburtstag: 01. März 1968  
Geburtsort: Hannover

## Schulausbildung:

06.74 - 06.78 Adolf-Reichwein-Schule Langenhagen  
07.78 - 07.80 Orientierungsstufe der Brinker Schule Langenhagen  
08.80 - 06.83 Gymnasium II Langenhagen  
08.83 - 05.88 Gymnasium Kaltenkirchen  
25.05.88 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife

## Berufsausbildung:

11.88 - 11.95 Studium der Chemie an der Universität Hannover  
06.92 Vordiplomprüfung  
04.95 Diplomprüfungen (Schwerpunktfach Biochemie)  
05.95 - 11.95 Diplomarbeit "Derivatisierungen von  $\alpha$ -Amanitin zur Entwicklung einer Analysenmethode" (Universität Hannover, Inst. f. Technische Chemie, Prof. Dr. Dr. K. Schügerl, in Zusammenarbeit mit der Med. Hochschule Hannover, Inst. f. Toxikologie, Prof. Dr. H.H. Wellhöner)  
06.11.95 Diplom des Studiums der Chemie  
12.95 – 12.99 Promotionsarbeit „Bindung und Transport von Tetanustoxin an neuronalen Zellen in vitro“ (Universität Hannover, Inst. f. Technische Chemie, Prof. Dr. T. Scheper in Zusammenarbeit mit der Med. Hochschule Hannover, Inst. f. Toxikologie, Prof. Dr. H. Bigalke)  
seit 10.96 Studium der Humanmedizin an der Med. Hochschule Hannover  
09.98 Ärztliche Vorprüfung Humanmedizin  
08.99 Erstes ärztliches Staatsexamen  
seit 01.2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Kinderklinik der MHH, Labor für pädiatrische Nieren- und Stoffwechselerkrankungen, Abt. II, Prof. Dr. med. J. H. Ehrich

Hannover, den